



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUIMICA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**DIAGNOSTICO MORFOLOGICO, CITOQUIMICO  
E INMUNOFENOTIPICO DE LEUCEMIA  
AGUDA EN NIÑOS MEXICANOS.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE  
ESPECIALIZACION EN BIOQUIMICA CLINICA**

**P R E S E N T A :**

**ANGELA SUSANA RAMIREZ ROMAN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

*Para la realización de este trabajo, conté con el apoyo de mi tutor, el Dr. Rogelio Paredes Aguilera y la ayuda incondicional de todo el personal del laboratorio de hematología del Instituto Nacional de Pediatría. así como el entusiasta apoyo de mis maestros: Dra. Rebecca Franco-B., M.C. Eva Hilda González, Dr. Hugo Rieman y de mis compañeras: Ma. del Carmen Sarabia, Olga Villegas, Angeles Granados, Na. Kathur Palomares y Rocío Flores S. a todos ellos mi más profundo agradecimiento.*

## I N D I C E

	<i>Pag.</i>
I. - ANTECEDENTES	1
II. - INTRODUCCION	3
III. - CLASIFICACION CITOMORFOLOGICA DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS	6
IV. - CLASIFICACION CITOQUIMICA DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS	13
V. - CLASIFICACION INMUNOFENOTIPICA DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS	18
VI. - CITOGENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE LA LEUCEMIA	27
VII. - OBJETIVO	31
VIII- HIPOTESIS	31
IX. -MATERIAL Y METODOS	32
A. - Población de estudio	32
B. - Material biológico	33
C. - Instrumental	33
D. - Reactivos	34
E. - Metodología	35
X. - RESULTADOS	48
XI. - DISCUSION Y CONCLUSIONES	67
XII. - BIBLIOGRAFIA	70
APENDICEA	80
APENDICE B	83

## **I- ANTECEDENTES**

*La leucemia es una enfermedad que se conoce como tal desde hace aproximadamente 150 años, aunque su sintomatología ha sido descrita y reportada desde la antigüedad (1). Sin embargo, con el conocimiento de la circulación de la sangre, el descubrimiento del microscopio, la diferenciación de los elementos formes de la sangre, su nomenclatura y posteriormente la observación de la abundancia de los leucocitos en los pacientes que sufrían y morían de esta enfermedad (investigaciones post-mortem al principio), llevó a los científicos del siglo pasado, en especial a Bennett y Virchow a denominar a esta enfermedad: leucocitemia, el primero y leucemia el segundo (2).*

*Muchos científicos en diferentes partes del mundo han estudiado a pacientes con leucemia, sobre todo a partir de la segunda mitad del siglo pasado a la fecha. Son reconocidos los grupos ingleses, franceses, norteamericanos, australianos, japoneses y mexicanos, entre otros.*

*En nuestro país ocurre en la medicina, lo que en muchas áreas de la ciencia, donde con todo derecho muchos grupos se dedican a la investigación del mismo tema en forma separada. La hematología no es la excepción y en el presente caso, el Instituto Nacional de Pediatría, que debería por su naturaleza ser el encargado de todos los casos hematológicos en niños, comparte sus esfuerzos con otras instituciones, ya sea en la capital o en toda la República. Esto explica el hecho de que a pesar de tener 32 pacientes diagnosticados en 7 meses, con padecimientos de leucemia aguda, este estudio no significa más que una muestra de lo que puede ocurrir en todo el país.*

*La población estudiada fueron todos pacientes de 0-17 años (pediátricos), con diagnóstico presuntivo de leucemia que acudieron al Instituto Nacional de Pediatría de la ciudad de México en un período de 7 meses. La mayoría, si no todos, fueron atendidos por los hematólogos pediatras, mismos que son los que hacen el*

diagnóstico presuntivo y toman las muestras de médula para el estudio en el laboratorio de hematología del mismo Instituto.

Los frotis de médula ósea teñidos con Wright fueron revisados en el laboratorio por los hematólogos, para su clasificación citomorfológica, según los criterios establecidos por el grupo cooperativo Franco Americano Británico (FAB) (3 y 4). Otros frotis fueron teñidos con diversos colorantes para su ulterior identificación citoquímica y leídos posteriormente. Con médula ósea disuelta en un buffer de fosfatos y con heparina como anticoagulante se realizó la inmunotipificación. Todas las observaciones se hicieron al microscopio con objetivo de inmersión, para la clasificación por inmunofenotipo se utilizó inmunofluorescencia.

## II. -INTRODUCCION

Las células sanguíneas derivan de una célula pluripotencial (stem cell) de médula ósea, que tiene la propiedad de limitar progresivamente la expresión de diferenciación caracterizada por cambios secuenciales en morfología, citoquímica, antígenos de superficie y hasta rearrreglos génicos para comprometerse con un solo linaje, respetando así el principio de fidelidad de estirpe.

Las leucemias resultan de una proliferación autónoma de elementos hematopoyéticos. Las células anormales exhiben patrones morfológicos caracterizados por la detención en su maduración. Son un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por la expansión clonal maligna de una línea celular 'que tiene las siguientes características: 1) mala respuesta a los mecanismos reguladores, 2) tendencia a tener menor capacidad de diferenciación celular normal, 3) capacidad de expandirse a expensas de las líneas mieloides normales, 4) una posible capacidad de suprimir o deteriorar el crecimiento de células mieloides normales'(5).

Las leucemias que de manera tradicional se consideraban como agudas, en base a sus características citoquímicas y morfológicas (grupo Fab)(3,4,10), y a la duración del padecimiento, actualmente se estudian y tratan en dos grandes grupos: agudas y crónicas.

Mediante el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de superficie e intracitoplásmicos se han documentado casos de pacientes con leucemia aguda con heterogeneidad de estirpe, que expresan marcadores linfo-mieloides o asincronía en la estirpe, sugiriendo que la fidelidad de línea es violada como resultado de una 'mala programación genética'(11)

Las leucemias también se ha considerado que constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias, ya que la proliferación celular deriva de la transformación maligna de las células hematopoyéticas, principalmente en la médula ósea y los tejidos linfoides, donde interfieren con la inmunidad y con la hematopoyesis normal. Finalmente emigran a la periferia y pueden infiltrar otros tejidos (6).

Ya se ha dicho que las leucemias se clasifican según el tipo celular. Con la máxima frecuencia, la célula pertenece a la serie blanca, pero ocasionalmente puede ser de la línea megacariocítica (7) o de la serie eritroide (8). 'Habitualmente la leucemia afecta a una sola línea celular, pero se reconoce actualmente la existencia de las llamadas leucemias de fenotipo mixto, en las cuales hay una subclona de células que posee marcadores superficiales característicos de las células mieloides tempranas y otra subclona cuyos marcadores superficiales son típicos de las formas linfocíticas precoces' (9).

Las leucemias agudas, crónicas o de forma intermedia o variable son una enfermedad que sin tratamiento puede ser fatal a corto plazo.

**ETIOLOGIA DE LA LEUCEMIA.** - Hasta la fecha, no se sabe con precisión cual es la causa que origina la proliferación celular desordenada que caracteriza al padecimiento leucémico, se ha sugerido la influencia de factores ambientales, genéticos, virus y en la actualidad con métodos de biología molecular se han encontrado mutaciones en genes como el p53, (12) que se considera pueden dar lugar a una leucemia.

En relación al medio ambiente, la radiación ionizante se ha considerado como uno de los principales factores predisponentes a la leucemia, así como algunos agentes químicos sobre todo los aromáticos como el benceno, los insecticidas, pesticidas y conservadores y saborizantes, aunque no se puede asegurar nada en concreto respecto a estos productos químicos.

En lo que se refiere a factores genéticos, algunos trastornos congénitos son predisponentes a la leucemia, y a los pacientes que los padecen se les considera como de muy alto riesgo. Estos son los síndromes de Down, de Bloom, de Klinefelter, de Fanconi y de Wiskott-Aldrich.

En lo tocante a los virus, se ha aislado el virus HTLV-I de pacientes con leucemia de células T y se considera que éste es el

agente causal. De pacientes con leucemias crónicas, raras y mal definidas de células T se ha aislado el virus HTLV-II. (6)

**CARACTERISTICAS CLINICAS DE LA LEUCEMIA.**- 'Los síntomas más comunes al momento del diagnóstico son: fatiga, dolor óseo, pérdida de peso, púrpura y sangrado anormal. Los hallazgos más comunes en la exploración física son: Esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatía, púrpura y palidez. La fatiga es causada en parte por la anemia, el dolor óseo es derivado de la invasión de las cavidades por el proceso leucémico, mientras que la púrpura y el sangrado anormal están relacionados con la trombocitopenia. La palidez es debida a la anemia y la esplenomegalia, hepatomegalia y linfadenopatía se deben a la infiltración de células leucémicas. La neutropenia hace que los pacientes sean susceptibles a las infecciones y a la fiebre, pero la fiebre es secundaria a la leucemia más que la infección. La coagulación intravascular diseminada (CID) puede ocurrir en cualquier leucemia aguda, pero es más común en la leucemia aguda promielocítica. La afección meníngea se produce como un síntoma neurológico. La transformación de leucemia aguda linfocítica en reticulosis medular histiocítica es reportada por Shreiner en 1975' (1).

**Incidencia y prevalencia.**- 'La incidencia de todas las leucemias es aproximadamente de 13 casos por cada 100,000 personas por año. La incidencia de las leucemias, tanto agudas como crónicas, es algo más alta en varones que en mujeres. La leucemia aguda linfocítica es principalmente una enfermedad de niños y adultos jóvenes, mientras que la leucemia aguda mielocítica aparece a todas las edades. Las leucemias crónicas, así como la de células peludas, tienden a aparecer en los ancianos.(6)

### III. -CLASIFICACION CITOMORFOLOGICA DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS.

Como se ha mencionado anteriormente, existe un grupo cooperativo Franco-Americano-Británico para el estudio citomorfológico de las leucemias conocido internacionalmente por las siglas FAB, la finalidad de este grupo ha sido la de tener un sistema uniforme de clasificación y nomenclatura de las leucemias agudas que sirva para definir las características de cada entidad en particular y que haga menos ambigua y más objetiva la clasificación morfológica (3).

La clasificación de la FAB está basada casi enteramente en la apariencia morfológica de los frotis de médula ósea y sangre periférica teñidos con colorante Romanowsky y también en ciertos casos con reacciones citoquímicas. Los frotis de sangre son esenciales especialmente en las leucemias mieloides, pero no son considerados indispensables ni suficientes para el diagnóstico.

Las leucemias linfoblásticas se han considerado de 3 tipos llamados L1, L2, y L3 definidos de acuerdo a) las características citológicas individuales y b) el grado de heterogeneidad en la distribución entre la población celular leucémica. Las características consideradas son: tamaño de la célula, cromatina nuclear, forma del núcleo, nucleolos, cantidad y basofilia del citoplasma. Cada una de estas características en más de un 10% de las células son consideradas para cada tipo.

**CARACTERISTICAS DE L1.** - Células predominantemente pequeñas, dos veces el diámetro de un linfocito pequeño, aunque varía su tamaño. La cromatina nuclear es variable de caso en caso pero es homogénea. La forma del núcleo es irregular, pero presenta hendiduras o dientes y pliegues característicos. Los nucleolos no son visibles. Frecuentemente, cuando están presentes son pequeños, no prominentes. El citoplasma es generalmente escaso (es grande el radio núcleo citoplasma). Es poco común la basofilia citoplásmica profunda.

**CARACTERISTICAS DE L2.** - Generalmente la mayoría de las células son de tamaño mayor a 2 veces un linfocito, en muchos casos hay una marcada heterogeneidad en el tamaño celular. La cromatina nuclear

varía de finamente dispersa a condensada en grumos y es una característica heterogénea en cada caso. Las hendiduras y los pliegues nucleares así como las indentaciones son gruesas y características. Los nucleolos siempre están presentes y son variables en tamaño y número, frecuentemente son abundantes. La cantidad de citoplasma de las células en cada caso es variable pero generalmente es abundante, la basofilia del citoplasma es variable y en algunos casos es muy marcada.

**CARACTERÍSTICAS DE L3 (tipo Burkitt).** Estas son células grandes y homogéneas, tienen cromatina nuclear densa pero finamente moteada. El núcleo es de oval a redondo y es regular. En la mayoría de las células hay uno o más nucleolos prominentes y vesiculares. La basofilia del citoplasma es intensa en todas las células. Se puede encontrar casi un 5% de índice mitótico en forma característica. La vacuolización del citoplasma es prominente y frecuente en la mayoría de las células; la vacuolización podría presentarse en L1 y L2 pero es menos prominente que en L3.

La leucemia linfoblástica L1 representa el tipo de leucemia aguda común en la infancia, L2 es menos común y requiere de otros estudios para su diferenciación de la leucemia mieloblástica M1.

**CLASIFICACION DE LAS LEUCEMIAS MIELOIDES.** - Se describen 7 tipos de leucemias mieloides: M1, M2, M3, M4, M5, M6 y M7 definidos de acuerdo: a) la diferenciación entre una o más líneas celulares y b) el grado de maduración de las células. M1, M2 y M3 muestran diferenciación granulocítica y difieren una de otra en la naturaleza y extensión de la maduración de los granulocitos; M4 presenta diferenciación granulocítica y monocítica, M5 tiene diferenciación predominantemente monocítica, M6 presenta diferenciación eritrocítica y M7 es megacariocítica.

**M1. LEUCEMIA MIELOBLASTICA SIN MADURACION.** - Las células en la médula ósea tienen evidencia de diferenciación granulocítica y muestran a) blastos en frotis de médula teñidos con Romanowsky, los cuales son no granulares y generalmente contienen uno o más nucleolos; 3% o más de blastos son mieloperoxidasa positivos o b) puede existir una proporción variable de blastos que contienen pocos gránulos azurófilos, bastones de Auer o ambos.

**M2 LEUCEMIA MIELOBLASTICA CON MADURACION.** - Las características que la distinguen es la maduración al estado promielocítico que son células más grandes que los granulocitos normales y contienen numerosos gránulos azurófilos. Más del 50% de las células en la médula ósea son mieloblastos y promielocitos, frecuentemente nucleadas con cantidades variables de citoplasma, generalmente con muchos gránulos azurófilos. Son comunes las células con bastones de Auer. En raros casos los mielocitos, metamielocitos y granulocitos maduros son eosinófilos.

Los mieloblastos bilobulados o reniformes pueden confundirse con monocitos, tienen pequeños nucleolos, un modelo de cromatina fina y citoplasma menos abundante que carece del color grisáceo característico de los monocitos. El uso de reacciones citoquímicas específicas para monocitos ayuda en estos casos. El polimorfismo de las células en la M2 puede mostrar anomalías de diferentes proporciones y combinaciones; puede tener pocos o ningún gránulo, su núcleo semeja a la anomalía de Pelger-Hüet y carecer de actividad a la mieloperoxidasa. Los casos de hiperplasia eritroide con menos de 50% de eritroblastos, sin anomalías morfológicas de eritroleucemia se incluyen en este grupo.

**M3 LEUCEMIA PROMIELOCITICA HIPERGRANULAR.** - Las características de M3 son: a) la gran mayoría de las células son promielocitos anormales, con un modelo de granulación gruesa singular, b) el núcleo varía en tamaño y forma y generalmente es reniforme o bilobulado, c) el citoplasma de la mayoría de las células está completamente ocupado por gránulos grandes, coalescentes teñidos de rosa brillante rojo o púrpura. Las células presentan abundantes bastones de Auer distribuidos en el citoplasma (células 'faggot'), d) hay una alta proporción de promielocitos hipergranulares y células faggot rotas, con gránulos y bastones de Auer libres y entre las células.

**M4 LEUCEMIA MIELOMONOCITICA.** - En las células de la médula ósea y de sangre periférica existe una proporción variable de granulocitos y monocitos. M4 se parece a M2 en todos los aspectos, excepto en la proporción de promonocitos y monocitos que excede al 20% de las células nucleadas en médula ósea y sangre periférica; sin

embargo, los promonocitos y promielocitos no son fácilmente identificados con la tinción de Romanowsky y se deben usar preparaciones citoquímicas específicas para monocitos. La diferencia entre M2 y M4 es la alta cuenta de promonocitos, monocitos o ambos en sangre periférica, si el porcentaje de monocitos excede al 20% la leucemia se clasifica como M5.

**M5 LEUCEMIA MONOCITICA.**- El diagnóstico basado en frotis teñidos por Romanowsky requiere siempre confirmación por métodos citoquímicos. Puede haber dos subtipos: a) leucemia monoblástica pobremente diferenciada caracterizada por blastos grandes en médula ósea y en sangre periférica que tienen cromatina delicada y 1 a 3 nucleolos ocasionalmente, los cuales son grandes, prominentes y vesiculares. El citoplasma es voluminoso, frecuentemente con uno o más pseudópodos, basofílico con gránulos azurofílicos. Los pseudópodos o yemas podrían ser más translúcidos que el resto del citoplasma y tienen apariencia de una membrana doble, hay un bajo porcentaje de monocitos presentes; b) leucemia monocítica o diferenciada: se encuentran frecuentemente monoblastos, promonocitos y monocitos pero la proporción de monocitos en sangre periférica es superior a la de la médula ósea, en la cual predominan los promonocitos. Estas células son parecidas a los monoblastos pero tienen un núcleo grande de apariencia cerebriforme; el nucleolo puede estar presente, el citoplasma es basofílico con apariencia grisácea y finos gránulos azurofílicos distribuidos en toda la célula.

**M6 ERITROLEUCEMIA.**- Esta enfermedad fue descrita por Di Guglielmo en 1917, pero fue Dameshek el que dió la definición moderna en 1969(13), describiéndola como 'un desorden mieloproliferativo con fuerte hiperplasia eritroide de la médula ósea o de tipo megaloblástico, megaloblastoide o normoblástico y de desarrollo gradual con incremento del número de mieloblastos'.

Según la FAB (3) la eritroleucemia presenta un componente eritropoyético que excede al 50% de células nucleadas en la médula ósea y muestra eritroblastos, de características morfológicas bizarras, especialmente lobulación múltiple del núcleo con variación de tamaño de los lóbulos, múltiples núcleos, presencia de uno o más

fragmentos nucleares, formas gigantes y características megaloblastoides. La proporción de eritroblastos con diseritropoiesis bizarra excede al 10% y otras anomalías de M6 pueden estar presentes, pero un componente eritropoyético de 30% puede ser suficiente. En sangre periférica se encuentran frecuentemente eritroblastos. Las células granulopoyéticas muestran un incremento en la proporción de mieloblastos y promielocitos y podrían verse bastones de Auer. El porcentaje de mieloblastos y promielocitos acompañados por los cambios diseritropoyéticos es variable, pero menos de 30% de células nucleadas es una alternativa de diagnóstico de un síndrome dismielopoiético. (10 y 13)

**LEUCEMIA MEGACARIOCITICA AGUDA O M7.** - Los blastos en la leucemia megacariocítica o M7 están clasificados como indiferenciados según los criterios previos de la FAB. Las células aparecen altamente polimórficas, teniendo forma redonda con cantidades de citoplasma esparcido y cromatina densa, semejante a linfoblastos L1, y otras células parecidas a L2, con o sin gránulos y con uno o más nucleolos prominentes. Los núcleos son redondos y la cromatina finamente reticulada, la heterogeneidad de tamaño es de un 20 a 30% de los blastos los cuales son dos a tres veces más grandes que los linfocitos. A veces las células, ya sea en médula ósea o en sangre periférica pueden presentar algunas protuberancias en el citoplasma o megacariocitos en diferenciación, en los cuales las plaquetas pueden estar en grupos o rodeando a la célula, cuando se ven fragmentos de megacariocitos en sangre periférica se debe considerar un componente megacarioblástico significativo. El diagnóstico debe completarse con tinciones citoquímicas, marcadores de superficie y citogenética.

Por otra parte se han reportado casos de pacientes con blastos típicos de leucemia linfoblástica y que presentan granulaciones (14) Estos casos han sido diagnosticados en base a citoquímica, marcadores inmunológicos o citogenética como Leucemia linfoblástica aguda granular.

*Una variación de la leucemia granulocítica crónica descrita desde hace muchos años es la 'leucemia basofílica'(15) que posteriormente ha sido llamada Leucemia Aguda no Linfocítica con diferenciación Basófila por sus características físicas y citoquímicas*

*Clasificación FAB de las leucemias agudas(13)*

---

*Leucemia aguda linfocítica*

*L1 típica de niños*

*Células pequeñas*

*Radio núcleo/citoplasma alto*

*Nucleolos no distinguibles*

*L2 tipo 'adulto'*

*Células grandes, de tamaño heterogeneo*

*Citoplasma más abundante que el tipo L1*

*Nucleolos prominentes*

*L3 tipo 'Burkitt'*

*Células grandes de tamaño heterogeneo*

*Citoplasma con basofilia profunda y vacuolas prominentes.*

*Leucemia aguda no linfocítica*

*M1 Leucemia mieloblástica sin maduración*

*M2 Leucemia mieloblástica con maduración*

*M3 Leucemia promielocítica hipergranular*

*M4 Leucemia mielomonocítica*

*M5 Leucemia monocítica*

*M6 Eritroleucemia (síndrome de diGuglielmo)*

*M7 Leucemia megacariocítica*

---

#### IV. - CLASIFICACION CITOQUIMICA DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS.

Las técnicas citoquímicas han significado una ayuda considerable a la clasificación morfológica. A partir del siglo pasado cuando Paul Ehrlich buscando su 'bala mágica' desarrolló métodos de tinción diferencial,(1) un gran número de investigadores han buscado reacciones que sirvan esencialmente para dos propósitos: 1) identificar los componentes no enzimáticos de las células como el glicógeno y los lípidos y 2) conocer la reacción coloreada de algunas enzimas como la mieloperoxidasa y las esterases.(13,16,17,18).

Las reacciones citoquímicas más conocidas y utilizadas son:

- 1) Acido peryódico de Schiff conocida como PAS
- 2) Mieloperoxidasa
- 3) Sudán Negro
- 4) Esterasas
- 5) Fosfatasa ácida

1.-La reacción del ácido peryódico de Schiff identifica a una variedad de carbohidratos naturales incluyendo: monosacáridos, polisacáridos, glicoproteínas y mucoproteínas(13). Ya que las células linfoides inmaduras son generalmente mucho más ricas en glucógeno que las mieloides y monocitoides, la reacción de PAS es de particular importancia para distinguir a la leucemia linfoblástica aguda de la leucemia no linfoblástica, ya que los linfoblastos muestran gránulos citoplásmicos gruesos muy característicos. Los mieloblastos son PAS negativo o podrían teñirse de una manera muy difusa. Los monoblastos pueden ser negativos completamente o tener algún grado de positividad desde punteado fino a gránulos gruesos. Los eritroblastos pueden ser positivos en proporción variable.

Esta reacción aún cuando se considere en tres grados diferentes de positividad: bajo, intermedio y alto, hasta la fecha no representa ningún valor pronóstico(19), Hayhoe, Quaglino y Flemans (20) sugieren la utilización de las láminas teñidas primero con la tinción de Romanowsky para la reacción de PAS y reportan buenos

resultados, sin embargo nosotros preferimos utilizar frotis sin teñir para cada una de las pruebas citoquímicas. Por otra parte Quaglino y Hayhoe (21) reportan que la digestión hecha con saliva reduce la positividad de los eritroblastos en la enfermedad de Di Guglielmo hasta volver a las células negativas a la reacción de PAS.

2.-La demostración de la actividad de la enzima peroxidasa en los leucocitos ha sido de valor para los Hematólogos desde principios de siglo. Se han descrito muchas técnicas basadas en el uso de bencidina como indicador, este compuesto cuando se oxida precipita como cristales o gránulos de color café o azul (22).

Como el uso de la bencidina se demostró que era carcinogénico se ha sustituido por el dicloruro de bencidina, que aunque también es carcinogénico es menos peligroso que la primera.

La actividad de la peroxidasa está representada por pequeños gránulos de color azul en el citoplasma de granulocitos y monocitos, los eosinófilos se tiñen más intensamente y los gránulos son de color café-negruzco o azul oscuro, los monocitos presentan menos actividad que los granulocitos. Todos los elementos de la sangre y médula ósea se tiñen incluyendo a los basófilos.

3.-El negro sudán es un colorante dis-azo neutro que tiñe a una gran variedad de lípidos. Reacciona con los componentes fosfolipídicos de la membrana de los gránulos azurófilos primarios de las células mieloides y podría combinarse químicamente con los componentes no lipídicos de la célula. Los linfoblastos por el contrario son sudán negro negativos. Los monoblastos y los promonocitos son menos positivos al sudán negro que los mieloblastos y promielocitos. (16)

El incremento de la positividad al sudán negro en la leucemia aguda mielóide es una característica morfológica importante para predecir la remisión y sobrevivencia, también se ha considerado que la positividad puede predecir la duración de la remisión (23).

4.-Se han probado varias reacciones para las esterases, entre ellas: alfa naftil acetato esterasa (ANAE), Cloroacetato esterasa, alfa naftil butirato esterasa y esterases no específicas.

El uso de alfa naftil acetato esterasa (ANAE) y AS-D naftil

cloroacetato como sustrato ayuda a la diferenciación entre tres tipos de leucemia aguda, pues se ha demostrado una fuerte positividad a la alfa naftil acetato esterasa en los megaloblastos, pero la mayor actividad de la esterasa es en los monocitos y monoblastos, por lo que es un buen indicador de M4 y M5.(24)

La demostración bioquímica de la actividad de la alfa naftil acetato esterasa como indicador de linfocitos T fué probada por Knowles y colaboradores (25) quienes nos indicaron que el modelo de tinción con esterasa es diferente entre linfocitos T y monocitos y puede ser reproducible, representando una alternativa a la formación de rosetas con eritrocitos de carnero, la cual también se usa para clasificar a los linfocitos T. (técnica inmunológica)(26).

Las esterases (lipasas y colinesterasas) pueden hidrolizar alfa naftil ésteres, porque las colinesterasas son las responsables de esta reacción(27) tanto en los leucocitos como en otras células de los diferentes órganos linfoides. La posible localización de la actividad de la enzima ha sido estudiada al microscopio de campo oscuro después de una reacción citoquímica y se han encontrado cuerpos redondos como vesículas que también contienen fosfatasa ácida (28) Estas vesículas se han identificado como lisosomas.

5.-La fosfatasa ácida es una enzima lisosomal localizada en los gránulos azurófilos de los granulocitos y monocitos, la actividad de la fosfatasa ácida es generalmente más pronunciada que la de la mieloperoxidasa en los monocitos. En el 90% de los casos de leucemia aguda de células T, se ha encontrado actividad de fosfatasa ácida en la región perinuclear, en contraste menos del 10% de linfoblastos de células no T son positivos a la fosfatasa ácida(13)

La técnica de la tinción de fosfatasa ácida está basada en el uso de derivados del ester de fosfato As-naftol como sustrato y hexazonio de pararrosanilina como complejo(29).

La tinción de fosfatasa ácida ha sido reportada positiva con característica fuerte en la región de Golgi de los linfoblastos T, sin embargo es necesario el uso de marcadores inmunológicos porque puede haber confusiones al resultar positivos los frotis de leucemia

aguda linfocítica no T. (30). Otros autores sugieren el uso de la fosfatasa ácida y la formación de rosetas para la diferenciación de los linfocitos T, ya que se ha observado que puede haber hasta un 90% de células no T que den resultado positivo a la tinción de fosfatasa ácida. (31). Otros autores han observado también que con frecuencia son positivas a la fosfatasa ácida células de leucemia B, T y nula en una proporción muy similar(32). Janckila y colaboradores sugieren el uso de fosfatasa ácida resistente al tartrato para la identificación de los blastos en la leucemia de 'células peludas' (33) y reticuloendoteliosis, ya que la fosfatasa ácida de estas células es muy peculiar. Igualmente Katayama y colaboradores estudiaron también la reticuloendoteliosis leucémica de 'células peludas' con el uso de fosfatasa ácida resistente al tartrato (34) ya que usando el método di-azo con naftol AS-BI y ácido fosfórico como sustrato, se demostró la presencia de una isoenzima de la fosfatasa ácida.

Autores como Basso y colaboradores han estudiado los linfocitos T y los timocitos con tres diferentes tinciones citoquímicas como son la N-acetil-beta-glucosaminidasa, alfa-naftil-acetato-esterasa y alfa-naftil-butilato-esterasa, además de la fosfatasa ácida y han demostrado que la que da una positividad realmente significativa es la fosfatasa ácida(35).

Las áreas dependientes de células T en el tejido linfoide humano normal, son ricas en fosfatasa ácida, alfa-naftil-acetato-esterasa, beta-glucuronidasa y N-acetil-beta-glucosamina de gran actividad, mientras que las áreas que dependen de células B tienen muy bajo nivel de estas enzimas. En las leucemias linfoides con reacciones citoquímicas para este número de hidrolasas, se ha observado actividad de fosfatasa ácida y beta-glucuronidasa en las leucemias de células maduras e inmaduras de células T, en contraste con la reacción negativa de las células leucémicas B.(36)

Para identificar monocitos y granulocitos neutrófilos, eosinófilos y basófilos, se han usado métodos citoquímicos como cloroacetato-esterasa, esterasa no específica, peroxidasa y metacro-

*masia. Estos métodos son simples, sensitivos y fácilmente reproducibles. Los productos de reacción son altamente cromogénicos e insolubles en solventes orgánicos. Cualquiera de estos métodos se puede usar ya sea independientemente o combinados con otros métodos citoquímicos para demostrar el tipo de célula deseado. (37)*

*La leucemia aguda promielocítica o M3 que presenta como complicación más frecuente la coagulación intravascular diseminada puede ser estudiada citoquímicamente por las tinciones de: mieloperoxidasa, PAS, ASD-cloroacetato esterasa y ANAE (38) ya que da todas estas reacciones positivas.(39)*

*La beta glucuronidasa es una enzima hidrolasa, similar a la alfa naftil acetato esterasa y las fosfatasas ácida y alcalina. Las células que expresan actividad de beta glucuronidasa han sido pobremente caracterizadas en la evaluación de células linfoides malignas (40) Machin y colaboradores reportan un estudio en que relacionan la actividad de la beta glucuronidasa con otras enzimas hidrolasas como la ANAE y fosfatasas indicando que la positividad de esta enzima es suficiente para poder tomarse como prueba de diagnóstico.*

*Si la anemia refractaria sideroblástica fuera sin lugar a dudas una fase en el desarrollo de la eritroleucemia, se podría esperar un modelo similar de positividad al PAS de los eritroblastos en esta enfermedad, y quizá un número incrementado de gránulos sideróticos en los eritroblastos leucémicos (41), sin embargo se ha reportado un índice de positividad menor en esta enfermedad*

## V. - CLASIFICACION INMUNOFENOTIPICA DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS.

*Las técnicas inmunológicas se han usado para identificar antígenos celulares de la superficie de la membrana. Para aumentar la sensibilidad se han usado técnicas indirectas de dos o tres capas unidas a un anticuerpo primario el cual es reconocido por la aplicación de un anticuerpo secundario y posiblemente un anticuerpo terciario marcado.*

*Las técnicas más aplicables a la hematología son las de inmunofluorescencia , inmunoperoxidasa indirecta, fosfatasa inmunoalcalina indirecta o la fosfatasa alcalina anti fosfatasa alcalina (APAAP).*

*Todos los métodos son aplicables a células fijadas en frotis, sin embargo la inmunofluorescencia indirecta utiliza células en suspensión y tiene la ventaja de la rapidez y economía de reactivos por la poca cantidad que se usa para titular los antígenos.*

*Actualmente se ha incrementado la tendencia al uso de citómetros de flujo más que la microscopía de fluorescencia en los métodos de inmunofluorescencia, aumentando la rapidez y economía de reactivos, no así para los pacientes(17,42 y 43).*

*La inmunofluorescencia indirecta tiene la desventaja de que las preparaciones no son permanentes y la morfología de las células que son positivas no puede ser fácilmente determinada, lo que no sucede con las técnicas que utilizan frotis de sangre o médula ósea y que son permanentes (44)*

*Los anticuerpos monoclonales, utilizados para los métodos señalados anteriormente fueron preparados a partir de cultivos de células según los métodos descritos por G. Kohler y C. Milstein (45) los cuales fueron acreedores al Premio Nóbel por la importancia tan grande de su descubrimiento, ya que se han utilizado ampliamente desde entonces (1975)en muy diversas ramas de la medicina y otras ciencias.*

*Según Milstein 'las células secretoras de anticuerpos pueden hacerse inmortales fusionándolas con células tumorales, clonando los*

híbridos resultantes. Cada clon producirá de forma persistente, grandes cantidades de un anticuerpo, altamente específico'(46). 'Un anticuerpo monoclonal es un reactivo químico, bien definido, que puede reproducirse a voluntad, en contraste con un anticuerpo convencional que es una mezcla variable de especies químicas y nunca se puede reproducir cuando se agota el manantial original. Conforme se vayan obteniendo anticuerpos monoclonales, reemplazarán sin duda a los convencionales en muchos laboratorios clínicos y de investigación'.

'Los anticuerpos monoclonales preparados de componentes celulares indefinidos pueden ser usados para identificar la naturaleza de estos componentes, probar su función y también usarlos como reactivos para propósitos diagnósticos y terapéuticos. Estas son algunas de las propiedades fundamentales más importantes en la aplicación de los anticuerpos monoclonales' (47).

'Los recientes avances en la inmunología han sido importantes en la diferenciación del origen celular de la leucemia. Es posible ahora definir el estado de diferenciación de los linfocitos y granulocitos precisamente usando anticuerpos monoclonales específicos, (los cuales son marcadores de superficie) y posteriores pruebas moleculares para identificar el rearrreglo de las inmunoglobulinas y genes receptores de células T. Estos métodos pueden combinarse con los marcadores de membrana tradicionales SmIg, y las inmunoglobulinas del citoplasma (C Ig) en los linfocitos B, receptores de linfocitos en eritrocitos de carnero en células T y tinciones citoquímicas'(48).

El uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra una línea restringida de antígenos de superficie de células linfoides y mieloides, puede presentar algunas dificultades, ya que tradicionalmente se han definido a las células que expresan inmunoglobulinas de superficie como células morfológicamente indistinguibles de las células T, las cuales han sido clasificadas como formadoras de rosetas E con eritrocitos de carnero. Por el contrario, las células mieloides no solo no expresan SIg integral o no forman rosetas E, sino que expresan marcadores restringidos de

línea celular como los antígenos HLA clase II, que son receptores de complemento C3 y porción Fc de IgG. Existe actualmente un extenso panel de reactivos con los cuales es posible investigar la diferenciación hematológica neoplásica, estos anticuerpos monoclonales definen antígenos de superficie únicos que expresan las células mieloides y linfoides y se han denominado con las siglas CD conocida como nomenclatura de Cluster, para facilitar la clasificación de ambos, los anticuerpos monoclonales y los antígenos de superficie.(49)(59) (65).

La leucemia aguda linfoblástica, que es la más común en niños y adultos jóvenes, presenta para las células B los siguientes marcadores Tdt, DR, CD10, CD10, CD20, CD21, Cμ, y Sig.(50)(51)

Para las células T tiene los siguientes marcadores monoclonales TdT, CD2, CD7, T10, T9, Cd1, CD4, CD8, CD5, CD6, CD3 y DR1a.(52)

Para las leucemias mieloides se probaron los siguientes anticuerpos monoclonales: μ CD11, CD11b, CD13, My8, CD33, CD34(53) y, CD41, Gf, Ib, IIb/IIIa, y FVIII para las M6 y M7(7 y 8).

Los pacientes con leucemia aguda linfoblástica con marcadores T y B, comprenden del 70 a 80% de todos los casos de esta leucemia aguda,(54) sin embargo algunos marcadores monoclonales elaborados con linfocitos de conejo, han demostrado considerable heterogeneidad entre las poblaciones T y B definidas por marcadores de superficie, estos antisueros son de particular interés en la clasificación de las leucemias linfoblásticas agudas desde el punto de vista de su patogénesis:1) los antisueros reaccionan con la región común del antígeno HLA-DR,2) los antisueros se unen a antígenos específicos de los linfocitos T y pueden definir subgrupos de leucemia aguda linfoblástica T cuando son negativos a la formación de rosetas con eritrocitos de carnero y 3) reaccionan con todos los antígenos comunes o asociados de la leucemia aguda linfoblástica que se encuentran en aproximadamente 70% de las leucemias no B, no T y raramente en las B o T.(50)

La leucemia aguda linfoblástica común o CALLA, ha sido estandarizada en cuanto a los marcadores de superficie usados en su

identificación y clasificación especialmente el CD10 o Js(57)(66).

Las interacciones celulares involucradas en la modulación de la respuesta inmune por linfocitos T, son complejas y generalmente involucran mecanismos ayudadores y supresores. Las subclases de linfocitos funcionales se han identificado en humanos por receptores para inmunoglobulina, heteroantisueros, autoanticuerpos y anticuerpos monoclonales. Con técnicas de anticuerpos fluorescentes con heteroantisuero de conejo se ha identificado a los marcadores de clase supresora y son los CD4, que también son citotóxicos y los CD4 son los ayudadores e inductores de la respuesta inmune. (68)

Por medio de anticuerpos monoclonales también se han identificado otras enfermedades como la enfermedad de Hodgkin y los linfomas no Hodgkin(54), por medio de marcadores de linfocitos B.

También se han diagnosticado neoplasmas, micosis fúngicas, síndrome de Sézary sarcoma inmunoblástico T, y linfoma de grandes células pleomórficas (52) con el uso de anticuerpos monoclonales.

El grupo FAB reporta en 1988 un estudio para la clasificación de la leucemia aguda mieloide basado en características morfológicas, inmunológicas y Citoquímicas (55) en el cual la morfología sigue reportándose como en los primeros trabajos de la FAB (3 y 4), el inmunofenotipo (anticuerpos monoclonales) indica que cada caso de leucemia aguda debe identificarse en particular y según el primer reporte del grupo FAB-MIC los marcadores son los siguientes: CD11b, CD13, CD14, CD15, CD16.

Este mismo grupo FAB-MIC reporta las leucemias bilineales o bifenotípicas en las cuales se expresan los marcadores de las series mieloide y linfoide o son co-expresados por la misma línea de células leucémicas (leucemia bifenotípica). Estas leucemias representan una categoría única dentro de las leucemias agudas y son identificables únicamente por anticuerpos monoclonales.

Los estudios de las características superficiales de las células por métodos inmunológicos, han dado una nueva dimensión a la clasificación de las leucemias y al mismo tiempo nos ayudan a

entender el proceso mismo de la enfermedad (53,70).

Las células leucémicas fenotipadas por el uso de un panel de marcadores de superficie, además de identificar las características de un determinado grupo de leucemia nos indican la línea celular y probablemente el tejido que originó el problema (B, T o M) y por consiguiente son muy importantes en el monitoreo de la terapia de los pacientes leucémicos.

La clasificación inmunofenotípica tiene un significado pronóstico ya que la leucemia de células B y T maduras tiene peor pronóstico comparada con la leucemia aguda linfoblástica asociada al antígeno común CD10 que pertenece a la línea B inmadura que tienen mejor pronóstico. (57) Los estudios inmunológicos juntos con los de biología molecular, permiten establecer el nivel de diferenciación celular preciso, señalando el punto en el cual ocurrió la transformación maligna. Posteriores estudios podrían correlacionar los diferentes estadios de maduración, lo cual nos señalaría diferentes características de la leucemia linfoblástica. (66)

Los antisueros a células T humanas son usados para el diagnóstico de los pacientes con leucemia aguda linfoblástica T, así como para evaluar la efectividad de la terapia la cual podría distinguirse clínicamente en subgrupos para lo cual se han preparado antisueros adicionales para identificar la leucemia aguda no T en los pacientes con TdT positivo durante la crisis blástica de la leucemia mieloide crónica, esto sugiere que los antisueros pueden ser reactivos clínicamente útiles aún cuando su preparación sea por medio de tejidos humanos irremplazables por absorción y difíciles de duplicar (58). Estos antisueros han sido ampliamente probados en una gran variedad de tejidos hematopoyéticos normales y malignos y su reactividad ha sido correlacionada con los marcadores histoquímicos para la leucemia aguda linfoblástica comprobándose su eficacia.

También se ha demostrado que los antígenos mieloides pueden coexpresarse con los de la leucemia aguda linfoblástica de la infancia, lo cual puede estar relacionado con el curso desfavorable de la enfermedad, se han encontrado en leucemia linfoblástica nula

quizá bilineal o bifenotípica como fué indicado antes (59 y 60).

La diferencia de la expresión antigénica observada entre variados subgrupos de la FAB como en el subgrupo M3 de leucemia promielocítica en donde no se encontraron moléculas clase HLA, en las M4 donde marcaron los antígenos CD14 y CD36 al igual que en M5. El monoclonal CD34 fué reconocido en la mayoría de las leucemias mieloides como marcador troncular y se ha considerado que discrimina a M1, M2 de M4 y M5. (61) (62). Así como los antígenos Mo2 y Mo1 que son considerados como los únicos que pueden distinguir entre los diferentes estadios de maduración entre granulocitos y monocitos (71). También se ha reportado leucemia mielomonocítica con eosinofilia llamada M4Eo que tiene pronóstico favorable (72, 73).

La generación de anticuerpos monoclonales murinos que reaccionan con las células de leucemia y linfoma humano se ha utilizado recientemente para el tratamiento clínico de estas enfermedades. Varios estudios han demostrado que la infusión de anticuerpos monoclonales puede causar la depuración rápida y específica de las células leucémicas de la sangre periférica. Administrados intravenosamente pueden unirse a los linfoblastos de la médula ósea y con ello producen una regresión parcial del tumor cuyas células hayan infiltrado a los nódulos linfáticos y la piel. Desafortunadamente la respuesta clínica no se ha comprendido bien, pero estos estudios han identificado factores específicos que resultan en el desarrollo de resistencia a la lisis mediada por anticuerpos en vivo. Estos factores incluyen la presencia del antígeno circulante, la modulación del antígeno, la reactividad del anticuerpo monoclonal con células normales, la respuesta inmune al anticuerpo murino y la ineficiencia de los mecanismos efectores inmunes naturales. (63).

Por medio de anticuerpos monoclonales se ha logrado identificar blastos vacuolados en leucemia aguda linfoblástica que no es del tipo L3 como se sugirió en un principio (64), y que además esta leucemia presenta las características de ser menos agresiva y que responde bien a la terapia.

En cuanto a la leucemia M7 o megacariocítica, se han estudiado una variedad de anticuerpos monoclonales con la finalidad de clasificarla correctamente, siendo los marcadores Ib o IIb/IIIa los que identifican a las plaquetas los más usados, también se han descrito anticuerpos que reaccionan con la glicoforina IIIa como aquel marcador que identifica a los megacarioblastos maduros así como a células menos diferenciadas. El Monoclonal relacionado al factor FVIII, que también puede ser policlonal da resultados positivos con la leucemia megacarioblástica. (7).

Por otra parte se ha investigado un factor inhibidor de la leucemia (LIF), el cual purificado y clonado puede inducir la supresión de la proliferación de células leucémicas en ratón, pero también produce efectos diversos en los tejidos no hematopoyéticos, razón por la cual se encuentra en experimentación su uso en ratones para que de acuerdo a los resultados pueda ser empleado en humanos(67).

La leucemia de células peludas marca el antígeno OK1a-1 y OK1-1 simultáneamente por lo que son los marcadores que la identifican (74)(75).

Se han observado 3 tipos de discrepancias entre la clasificación morfológica, citoquímica e inmunofenotípica de las leucemias agudas, éstas son: 1) casos con morfología y citoquímica característica no marcan los antígenos de línea específicos, principalmente en los casos de leucemia pobremente diferenciada como M1, M2 y algunas M5, por lo que se piensa que las enzimas citoquímicas son los primeros marcadores mieloides antes que los anticuerpos monoclonales; 2) casos en los cuales las características inmunológicas no concuerdan con la morfología y citoquímica, como en algunas leucemias M2 que eran positivas al CD14, o algunas M4 que no lo tenían; 3) discrepancias debidas a infidelidad de línea (76,77).

Por otra parte, se han usado métodos para la detección de marcadores de superficie (monoclonales), conjugando éstos con microsferas fluorescentes y tiñéndolas con mieloperoxidasa, Sudán negro, cloroacetato esterasa, alfa-naftil-butirato-esterasa. Esta

técnica aplicada a población celular mixta de muestras de sangre periférica normal y médula ósea leucémica, nos da un análisis simultáneo de marcadores de superficie y citoquímica específica para cada una de las células (78), no es muy usual.

En relación al uso de anticuerpos anti-avidina-biotina, es importante reconocer la afinidad que la avidina tiene por pequeñas moléculas como la biotina. Conjugando en forma covalente biotina o avidina a moléculas de peroxidasa, no interfiere con las funciones bioquímicas normales. Las moléculas de avidina o biotina, conjugadas o no, tienen sitios antigénicos para el anticuerpo anti-avidina y se han descrito diversas técnicas inmunohistoquímicas basadas en este principio. El método sigue un proceso de 4 tinciones 1) anticuerpo primario, 2) anticuerpo secundario 3) anticuerpo antiavidina y 4) complejo avidina-biotina-peroxidasa (79).

Con el material obtenido en condiciones controladas, la especificidad y sensibilidad de este método ha sido considerado por algunos autores alternativo o superior a los de inmunofluorescencia (80).

La inmunotipificación por el método conocido como APAAP (fosfatasa alcalina anti fosfatasa alcalina), ha minimizado la acción de la peroxidasa endógena al incluir en forma indirecta la fosfatasa inmuoalcalina, por medio de técnicas inmunohistoquímicas, este método difiere al de peroxidasa antiperoxidasa (PAP) porque usa una inmunoglobulina conejo anti ratón no marcada ligada a un anticuerpo monoclonal primario y contra un anticuerpo monoclonal para fosfatasa alcalina (81).

La deoxinucleotidil-transferasa-terminal se ha usado como un marcador para el diagnóstico y clasificación de la leucemia aguda y es detectada bioquímica e inmunocitoquímicamente por inmunofluorescencia indirecta, aplicada a frotis de células fijadas con metanol, aunque se han usado los procedimientos de inmunoperoxidasa como alternativos y se ha demostrado la importancia de la determinación de TdT porque todas las leucemias linfoblásticas agudas dan TdT positivas y las mieloides TdT negativas (82).

*TdT es ahora reconocido como un marcador intracelular para los linfocitos inmaduros en el sistema hematopoyético. TdT se localiza específicamente en una fracción de los timocitos corticales y en menor proporción en los linfocitos de la médula ósea. El interés del TdT en medicina clínica y hematopatología, radica en el alto nivel de actividad enzimática de los glóbulos blancos en la médula de algunas leucemias (83).*

*TdT es una enzima nuclear única, que cataliza la polimerización de trifosfatos sin necesidad de un templado, fue detectada primero usando un método basado en la incorporación de un monómero deoxinucleótido inicial, actualmente se detecta por inmunofluorescencia o técnicas de inmunoperoxidasa con anticuerpos policlonales purificados por inmunoabsorción (80,81,82,83). También se ha usado la TdT unida a HLA-DR para cualificar la inducción a la remisión posterior a la quimioterapia en leucemia mieloide aguda con buenos resultados (85,86,87).*

## VI. - CITOGENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE LA LEUCEMIA

'Las técnicas mejoradas para el estudio de las propiedades cromosómicas de las células leucémicas brindan ahora la oportunidad de obtener clínicamente información que puede explicar las respuestas aparentemente anómalas al tratamiento. Se han relacionado anomalías cromosómicas específicas, como las traslocaciones recíprocas, con el resultado de la quimioterapia de combinación para la leucemia de la infancia, haciendo surgir la posibilidad del tratamiento individualizado con base en las características citogenéticas de los hemocitoblastos malignos de un paciente. Como la mayoría de los niños con leucemia tiene cariotipos constitucionales normales, la presencia de anomalías cariotípicas clonales en las células de la médula ósea puede proporcionar la única prueba definitiva de malignidad, especialmente cuando hay una sustitución incompleta de la Médula ósea por el proceso leucémico (88,89).

Cada banda cromosómica es numerada para poder describir el cariotipo o modelo cromosomal de las células malignas. Los cambios cromosómicos pueden ser por pérdida o ganancia de fragmentos de otro cromosoma. Para los casos de leucemia se procede a identificar las células directamente de la médula ósea después de cultivarlas de 1 a 3 días, se puede usar sangre periférica si el recuento de leucocitos es menor de  $15 \times 10^9$ /litro. Las células se colocan en una solución hipotónica, se fijan y tiñen según una variedad de protocolos (86).

'El marcador cromosómico 22q, que se identificó por primera vez en la leucemia mielocítica crónica, se encuentra también en cerca del 4% de los casos de leucemia aguda linfocítica infantil y en 19% de las leucemias linfocíticas agudas de los adultos. Este cromosoma derivado surge generalmente de una translocación cromosómica recíproca, t(9;22)(q34;q11) que es indistinguible citogenéticamente de la translocación que se encuentra en la leucemia mielóide crónica. Las leucemias agudas con esta translocación suelen tener un precursor de célula B o un fenotipo pre-B temprano, pero también se encuentra en casos de células T.'

*Cambios cromosómicos comunes en leucemia aguda*

---

<i>Tipo de leucemia</i>	<i>rearrreglo cromosómico</i>
<i>Linfoide B/mieloide</i>	<i>t(4;11)(q21;q23)</i>
<i>Precursor-B</i>	<i>t(9;22), del(6q)(q15;q21)</i>
<i>Pre-B</i>	<i>t(1;19)(q23;p13)</i>
<i>Leucemia B</i>	<i>t(8;14)(q24;q32), t(2;8)(p13;q24)</i> <i>t(8;22)(q24;q11)</i>
<i>Precursor T temprana</i>	<i>t(9p), del(9p)(p21-22)</i>
<i>Leucemia T</i>	<i>inv(14)(q11;q32) t(8;14)</i> <i>(q24;q11), t(10;14)(q24;q11),</i> <i>t(9;14)(p13;q11), t(7;7)</i> <i>(p15;q11), t(7;9)(q36;q34),</i> <i>t(7;14)(q35-q35;q11)</i>
<i>Leucemia mieloide aguda (M2)</i>	<i>t(8;21)(q22;q22)</i>
<i>Leucemia mieloide aguda (M3)</i>	<i>t(15;17)(q22;q12-21)</i>
<i>Leucemia mieloide M5</i>	<i>t(9;11)(p22;q23), t(11q),</i> <i>del(11q)</i>
<i>Leucemia M4 Mo</i>	<i>inv(16)(p13q22), t(16;16)</i>  <i>del(16q)</i>
<i>Leucemia M2/M4</i>	<i>t(6;9)(p23;q34)</i>
<i>Leucemia M4</i>	<i>t(3;3)(q21;q26), inv(3)</i>

---

*'Los pacientes con esta traslocación no han reaccionado bien a la terapia estándar para LAL, y a menudo no logran remisión o tienen recurrencias tempranas de su enfermedad'. Esta traslocación es lo que se conoce como cromosoma Filadelfia.(89)*

*Muchos investigadores combinan la morfología, citoquímica, citogenética e inmunofenotipo para la caracterización de los diferentes tipos de Leucemia (91),y pronto se agregarán las técnicas de biología molecular.*

*La leucemia y el cáncer en general, se originan por 'un trastorno de crecimiento y proliferación y los fenómenos que promueven y regulan el crecimiento son complejos, pueden ser secretados por la propia célula o producidos por otras células dentro de un tejido y estimulan la proliferación de una célula 'blanco' al fijarse en su superficie. La fijación de estos factores puede ser mediada por receptores de factor de crecimiento, o por receptores específicos con afinidad restringida de factores. Una vez fijo, este estímulo de interacción factor-receptor debe transducirse de la superficie celular, a través del citoplasma de la célula, al núcleo celular donde los genes reguladores del crecimiento se activan o desactivan y se realizan los procesos de replicación y mitóticos de la célula. Las fosforilasas, adenilciclasas, proteínas G y la vía del inositol fosfatidil, son algunos de los nombres de los factores envueltos en la mediación de este proceso de transducción.'(92)*

*Para los estudios de biología molecular se utilizan sondas que son fragmentos de ADN que sirven como templado a una fracción del ADN de la célula que se vaya a analizar, uno de los métodos que se han aplicado al estudio de las leucemias es el llamado Southern Blot o sea la observación y comparación de 'bandas representativas de una clona particular de células '. 'Si una de estas células sufre transformación maligna comienza a proliferar sin control y su patrón de rearrreglo particular comienza a proliferar' dando una banda significativa en el Southern. 'Muchas leucemias tendrán su propio conjunto singular molecular, como resultado de los rearrreglos que se*

realizaron para generar anticuerpos o una diversidad de receptores de antígeno de célula T' o B (92-93).

Los análisis fenotípicos usando anticuerpos monoclonales combinados con inmunoglobulinas y análisis de receptor genético de células T, han hecho posible la clasificación de la mayoría de las leucemias agudas no linfoblásticas, la leucemia aguda linfoblástica de células T, la de células B, y las leucemias agudas linfoblásticas de precursores de B, basándose en el origen de sus células. Estos estudios se han realizado por metodología Southern (94).

Ya he mencionado que existen varias translocaciones asociadas con el pronóstico de los procesos malignos, la detección de estos rearrreglos genéticos es de gran importancia, ya que el conocer los marcadores genéticos puede ayudar en el monitoreo de la llamada 'enfermedad mínima residual'. Para detectar estas anomalías se ha usado desde finales de la década pasada la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que presenta ventajas sobre otras técnicas por su alta sensibilidad y rapidez, aún cuando presenta la gran desventaja de resultar muy costoso el estudio en los procedimientos de rutina (95).

La 'enfermedad mínima residual' se produce casi siempre como resultado de las altas dosis de quimioterapia y radioterapia, con o sin trasplante de médula ósea, en los pacientes leucémicos y representa un problema continuo; es importante su detección para el tratamiento del paciente y para el monitoreo efectivo de la terapia que conduzca al restablecimiento y curación del paciente (96).

El mayor obstáculo ha sido el carecer de indicadores sensitivos, recientemente por medio de PCR, con lo que se consigue una amplificación de hasta 30 ciclos de un fragmento de ADN se tiene la esperanza de poder monitorear a la enfermedad mínima residual.

La enfermedad mínima residual en pacientes con leucemia aguda indica un pronóstico desfavorable, por lo cual es necesario aplicar alguna técnica, ya sea citogenética, análisis del rearrreglo de los genes, análisis inmunológico con antígenos específicos o biología molecular. (97)

## VII.-OBJETIVOS

1.- Realizar la clasificación citomorfológica e inmunofenotípica de leucemia aguda en niños mexicanos que acudieran a consulta al Instituto Nacional de Pediatría, durante un período de 7 meses, de febrero a agosto de 1992.

2.- Tratar de definir los patrones citoquímicos para cada uno de los tipos de leucemia aguda diagnosticada en la población estudiada, con las tinciones que estuvieron a disposición durante el tiempo en que se realizó el trabajo experimental.

## VIII.-HIPOTESIS

No existen diferencias étnicas o geográficas en los patrones citomorfológicos, citoquímico e inmunofenotípico en los niños estudiados. Entendiéndose aquí por etnia a la raza mestiza mexicana, a diferencia de la raza blanca, negra o amarilla de las cuales existen reportes bien documentados al respecto.

## IX. - MATERIAL Y METODOS

### A. - Población de estudio.

Después de una cuidadosa revisión de los expedientes de los 32 pacientes en el archivo clínico, encontramos que estos ingresaron con la sintomatología característica de la leucemia en todos los casos como se puede observar en la siguiente tabla:

---

Pacientes (n)	Condición al ingreso
26	con fiebre
23	con adenomagalias (cervicales y/o inguinales)
19	con hepatomegalia y esplenomegalia
17	con anorexia e hipoxia
11	con disnea
10	con petequias y/o equimosis
9	con dolor articular (o artralgias)
9	presentaban soplo sistólico
7	con pérdida de peso
5	acusaban cefalea
4	presentaban ataque al estado general
4	tenían huellas de epistaxis
3	Refirieron presentar vómito con o sin sangre
3	al auscultar tenían dolor abdominal
3	presentaban encefalopatía
2	sufrían de nefropatía
1	padecía hiperuricemia
1	presentaba parálisis facial
1	tenía cardiomegalia
1	sufría crisis convulsivas
1	padecía insuficiencia cardiaca congénita
1	presentaba síndrome de Down (trisomía 21)
1	tenía edema bipalpebral
1	con evacuaciones melénicas
1	presentaba compromiso al sistema nervioso

---

En lo que se refiere a la cantidad de hemoglobina que tenían al ingresar al Instituto Nacional de Pediatría, según los análisis realizados en el laboratorio de hematología se encontraron: 11 niños con cifras inferiores a 5 g/dl; 17 que tenían cifras entre 5 y 10 g/dl y solamente 4 tenían más de 10 g/dl. Con estos datos también se confirma el síntoma de anemia.

De los 32 pacientes, 13 presentaban un estado séptico, algunos con tratamiento de antibióticos y otros sin él.

#### B).- Material biológico:

El material de estudio consistió en muestras de Médula ósea, tomadas por aspiración (con trócar calibre 18), de cresta iliaca de los pacientes. Todas las muestras fueron tomadas por los médicos hematólogos pediatras y llevadas al laboratorio de hematología para su estudio. Se trabajaron 45 muestras, de las cuales 13 fueron recaídas y por eso no se incluyen los resultados en este trabajo de 'diagnóstico'. De todas los pacientes estudiados uno o dos presentaron impactación de médula, en este caso se procedió a realizar el diagnóstico con sangre obtenida por punción venosa.

Para el estudio inmunológico de formación de rosetas se utilizaron eritrocitos de carnero estériles, los cuales fueron proporcionados por el laboratorio de inmunología del propio Instituto.

Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron casi todos de la casa Coulter, algunos de Dakopatts, la inmunoglobulina  $\mu$  clonab BS 7 de la casa Biotest y el equipo para la inmunoglobulina de superficie SmIg de los linfocitos fué de la casa Sigma.

Los equipos para las tinciones citoquímicas fueron de la casa Sigma y algunos como el reactivo de Schiff, y el de peroxidasa, fueron pesados y disueltos en el propio laboratorio. El colorante de Wright utilizado consiste en polvo de Wright de la casa Merck.

#### C.- Instrumental:

Los aparatos y material de vidrio utilizados fueron:

Jeringas desechables de 20 ml. para la toma de muestras, con

*agujas de bisel No. 20*  
*Tubos de ensayo de 13 X 100 mm*  
*Tubos de plástico de 12 X 75 mm*  
*Tubos eppendorf*  
*Pipetas automáticas de 5-50µl, 10-100µl y 100-1000µl*  
*Pipetas serológicas de 1ml, 2ml y 5 ml.*  
*Probetas de vidrio de 50 y 100 ml*  
*Vasos de precipitado de 50 ml.*  
*Jarras de coplin*  
*Pipetas pasteur*  
*Gradillas*  
*Porta y cubre objetos*  
*Canastillas para tinción y sus recipientes de vidrio*  
*Centrífuga refrigerada IEC Centra-7R*  
*Balanza granataria Ohaus de 2 platillos*  
*Microscopio Olympus modelo Vanus para inmunofluorescencia*  
*Microscopio histológico binocular Zeiss*  
*Vórtex de Lab.-Ins Instruments*  
*Baño de agua Lab. Electrónicos*  
*Estufa Thelco*  
*Reloj marcador de intervalos*  
*Refrigerador doméstico pequeño.*  
*Cuarto frío*

**D. - Reactivos:**

*Alcohol etílico absoluto*  
*Alcohol metílico Absoluto*  
*Glicerina*  
*Citrato de sodio.*  
*Acido acético glacial*  
*Acetato de sodio.*  
*Acetona q. p.*  
*Formaldehído*  
*Acido peryódico.*  
*Peryodato de potasio*

*Acido nítrico q. p.*  
*Metabisulfito de sodio*  
*Acido clorhídrico*  
*Yodato de sodio*  
*Sulfato de potasio y aluminio*  
*Fenol*  
*Solución salina fisiológica*  
*Cloruro de sodio*  
*Fosfato diácido de sodio*  
*Fosfato monoácido de sodio*  
*Aceite de inmersión*

*E. - Metodología:*

*1. - Para el diagnóstico citológico, los frotis de médula ósea preparados por los médicos hematólogos al momento de la toma de muestra, fueron teñidos en el laboratorio de hematología con la coloración de Wright, la cual es una tinción policromática, que hace posible identificar los diversos tipos celulares tanto en médula ósea como en sangre periférica.*

*Principio de la prueba de coloración:*

*Los colorantes policromáticos son mezclas de azul de metileno alterado por calentamiento en solución de bicarbonato de sodio o en dicromato ácido (azur de metileno) y eosina. El azur de metileno es azul violeta y tiñe los componentes celulares ácidos como el núcleo y el ARN citoplasmático. La eosina es roja y tiñe los componentes más básicos, como la hemoglobina. Algunas estructuras se tiñen con ambos componentes. Los colorantes son soluciones metanólicas del precipitado que se forma al mezclar los dos colorantes. Debido a que estos son disueltos en metanol, la solución puede ser empleada tanto para fijar las extensiones de sangre o médula, como para teñirlas.*

*(Williams J. Williams. -Hematología tomo II. Pag. 1386. Ed. Salvat).*

*El colorante de Wright empleado para el diagnóstico citomorfológico de las leucemias es preparado en el laboratorio de hematología del Instituto Nacional de Pediatría de la siguiente manera:*

Polvo Wright (casa Merck)- - - - -	6 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (fosfato monodécido de sodio)- - - - -	18 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (fosfato diácido de potasio) - - - - -	12 g
Glicerol - - - - -	30 ml
Metanol - - - - -	1 L

Se muelen en mortero el polvo de Wright y las sales de potasio junto con el glicerol hasta obtener una mezcla homogénea, se le puede agregar metanol (del litro ya medido) para facilitar el molido y se pasa a un recipiente color ámbar donde se agita para terminar la disolución de la mezcla con el metanol, se checa el pH que debe ser de 6.7 y se incuba por lo menos 1 día a 37°Centígrados.

Al momento de utilizarlo se preparan 3 recipientes para la coloración, el primero con colorante de Wright puro, el segundo con colorante de Wright disuelto en agua en proporción de 1:9, (aproximadamente 50 ml de colorante y 450 ml de agua, la que puede ser destilada o de la llave) y el tercero con agua para lavar las láminas.

Para lograr una buena coloración el tiempo estimado para cada paso es de 1 minuto en el primer recipiente, 2 minutos en el segundo y lo que sea necesario en el tercero, además de lavar los frotis a la llave hasta que se considere que hayan eliminado el colorante superfluo.

Se dejan las láminas secar al aire y con una gota de aceite de inmersión se observan al microscopio.

2.- Para las coloraciones citoquímicas se utilizan los frotis que preparan los médicos hematólogos en la toma de muestra, una vez que se han secado al aire se procede según la técnica a utilizar.

a). Peroxidasa.- La enzima peroxidasa está presente en los gránulos de las células mieloides, actúa sobre el peróxido de hidrógeno dando lugar a la formación de agua y radicales altamente oxidantes, los cuales oxidan a la bencidina, que es un compuesto cristalino e incoloro a una bencidina azul como producto de oxidación; esta bencidina oxidada posee un color azul que posteriormente se torna a azul verde y finalmente a un café oscuro estable. La actividad de la peroxidasa aparece como gránulos de color

café obscuro. A esta tinción los monocitos son débilmente positivos o negativos; los mieloblastos, granulocitos maduros e inmaduros son positivos; los linfocitos y sus precursores, megacariocitos y eritroblastos son negativos'.(98)

Los reactivos para esta tinción se preparan como sigue:

Fijador:

Formaldehído al 36% - - - - - 10 ml

Etanol 96%- - - - - 90 ml

Solución de tinción:

Etanol al 30% (v/v) en agua - - - - - 100 ml

Dicloruro de bencidina - - - - - 0.3 g

ZnSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O(sulfato de zinc) al 0.132 M (3.8%) 1 ml

NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O(acetato de sodio trihidratado) - - - 1 g

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(peróxido de hidrógeno)al 3% - - - - - 0.7 ml

NaOH(hidróxido de sodio) 1N- - - - - 1.5 ml

Safranina O - - - - - 0.2 g (99)

Se prepara la solución agregando todos los componentes en el orden indicado, se ajusta el pH a 6.0, se filtra y conserva en frasco obscuro a temperatura ambiente, puede durar hasta 6 meses.

Se fijan las extensiones de médula ósea o sangre periférica con la solución fijadora por 1 minuto, en jarras de coplin. Se sacan los frotis, se lavan con agua corriente y se secan al aire.

Luego se colocan los frotis en otras jarras con la solución de tinción por 2 minutos, se sacan, se lavan con agua de la llave y con una gota de aceite de inmersión se observan al microscopio.

b). Acido peryódico de Schiff (PAS).-Los glicoles y los compuestos similares a los aldehídos se oxidan con el ácido peryódico y de esta manera reaccionan con el reactivo de Schiff, el cual 'es una solución incolora obtenida de la reducción de fucsina básica por el ácido sulfhídrico' que forma un complejo insoluble de color rojo brillante,' con el PAS reaccionan una gran variedad de compuestos intracelulares pero los más importantes son los carbohidratos(glucógeno), los cuales en algunos estudios se pueden bloquear con amilasa(21), dando una reacción negativa.

'El patrón de tinción puede ser granular, difuso o mezclado. En los granulocitos es difuso; en las células linfoides leucémicos , en

los mieloblastos de leucemia mieloblástica aguda y en los eritroblastos de eritroleucemia es granular. En un 80-90% de los casos de leucemia linfoblástica aguda los linfoblastos muestran una reacción PAS positiva, también se ha observado en un 10-15% de los casos de leucemia aguda mieloblástica.'

*Reactivos:*

*Solución fijadora*

Formaldehído al 36% - - - - - 10 ml

Etanol al 96% - - - - - 90 ml

*Acido peryódico*

KIO<sub>4</sub>(peryodato de potasio) - - - - - 0.69 g

Agua destilada c.b.p. - - - - - 100 ml

*Disolver por calentamiento y agregar*

HNO<sub>3</sub>(ácido nítrico) concentrado - - - - - 0.3 ml

*Se conserva a temperatura ambiente.*

*Reactivo de Schiff*

Fucsina básica - - - - - 1 g

Agua destilada - - - - - 100 ml

*Poner a ebullición el agua, en este momento se agrega poco a poco el colorante agitando fuera del calor, se enfría a 60°C, se filtra y se agrega:*

Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (metabisulfito de sodio) - - - - - 2 g

HCl(ácido clorhídrico) 1N - - - - - 20 ml

*Se incuba a temperatura ambiente en un frasco tapado de 18 a 24 horas y se le agrega*

Carbón activado - - - - - 300 mg

*Se agita por 1 minuto, se filtra y se conserva en frasco ámbar, o cubierto a 4° centígrados. El colorante se desecha cuando toma color rosa.*

*Metabisulfito de sodio:*

Metabisulfito de sodio - - - - - 1 g

Agua destilada - - - - - 100 ml

*Se prepara al momento de usarlo*

*Hematoxilina de Mayer, ya viene preparada de la casa Sigma.*

*Preparación de la Hematoxilina de Mayer:*

Hematoxilina de Mayer - - - - - 1 g

Agua destilada - - - - - 500 ml

Calentar a ebullición y agregar en orden

Agua destilada - - - - - 500 ml

NaIO<sub>3</sub> (iodato de sodio) - - - - - 0.2 g

KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (sulfato de potasio y aluminio) - - - - - 50 g

Agitar enérgicamente y conservar en frasco obscuro a temperatura ambiente.

Se fijan los frotis por 5 minutos en la solución fijadora. Al sacarlos se lavan con agua corriente y se dejan secar al aire. luego se colocan en las jarras coplin con el ácido peryódico preparado con anterioridad, durante 10 minutos, se sacan se vuelven a lavar con agua de la llave y se secan al aire.

Después se colocan los frotis en una jarra coplin que contenga el colorante de Schiff ( el cual se ha sacado con anterioridad del refrigerador) y se dejan 10 minutos, al cabo de los cuales se pasa a una jarra coplin que contenga el metabisulfito y se le dan 3 baños sucesivos de 1 minuto cada uno, luego se colocan en otra jarra coplin y se lavan al chorro del agua por 5 minutos, se secan al aire y se contratiñe con la hematoxilina de Mayer por 5-10 minutos, se seca al aire y se observa con inmersión al microscopio.

El conteo de las células para la tinción de PAS es de 200 células, con un contador digital de 8 teclas, dándoles una numeración o grado de positividad de + a 4+ y posteriormente multiplicando cada cantidad por el número de cruces para poder obtener un valor numérico que corresponda a: 1-150 bajo, 151-400 intermedio y >400 alto.

c) Negro sudán. - El Negro Sudán tiñe una amplia variedad de lípidos incluyendo grasas neutras, fosfolípidos y esteroides. Se usa para distinguir a las células mieloides de otros tipos celulares; ya que los gránulos de éstas son sudanófilos. Los blastos de la serie mieloides dan positiva esta coloración por lo que es distintiva como coloración citoquímica entre las leucemias linfoblásticas y las mieloblásticas.

Reactivos

Fijador:

Formalina al 40%

**Solución stock de Negro Sudán B:**

Negro Sudán B - - - - - 0.3 g  
Etanol absoluto - - - - - 100 ml

Esto se disuelve aproximadamente en 2 días a temperatura ambiente.

**Solución buffer:**

Fenol - - - - - 16 g  
Etanol absoluto - - - - - 30 ml

**Mezclar y agregar una solución de:**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  Fosfato monodico de sodio dodecahidratado 0.3 g  
Agua destilada - - - - - 60 ml

**Solución de tinción:**

Solución stock de Negro Sudán B - - - - - 60 ml  
Solución buffer - - - - - 40 ml

Se filtra por succión, esta solución es estable por varias semanas conservándola a temperatura ambiente.

La solución de contratinción Gill-3 se usó como estaba en el equipo de la casa Sigma. (Es similar a la hematoxilina de Mayer).

Se fijan los frotis con formol al 40% durante 5 minutos, se sacan se lavan con agua corriente, se secan al aire y posteriormente se colocan en un jarra coplin con la solución de Negro Sudán durante 15 minutos, se sacan, se lavan con etanol al 70%, se enjuaga con agua corriente, se seca al aire y se contratiñe con Gill-3 durante 5 minutos, al cabo de los cuales se sacan los frotis, se lavan con agua de la llave, se secan al aire y se leen al microscopio con el objetivo de inmersión.

d) Fosfatasa ácida.- 'Las fosfatasas ácidas son un grupo de enzimas capaces de hidrolizar ésteres de monofosfato en medio ácido. En humanos estas enzimas son clasificadas como eritrocíticas y no eritrocíticas de acuerdo a sus propiedades químicas y tejido de origen. En las células sanguíneas humanas existen 7 diferentes isoenzimas no eritrocíticas, todas, a excepción de la isoenzima 5 son sensibles a la inhibición por tartrato. Las isoenzimas 2 y 4 están presentes en neutrófilos y monocitos, la 3 en linfocitos y plaquetas, la 1a y 3b en blastos y la 5 en las células peludas de la tricoleucemia.'

El método recomendado para esta técnica es el de Goldberg y Barka que utiliza naftol AS-BI fosfato y pararrosanilina hexasotioionizada.

' La actividad de la fosfatasa ácida es incrementada en los neutrófilos de pacientes con inflamación aguda ,leucemia mielocítica crónica. En los linfocitos, la actividad enzimática en las células T es mucho más alta que en las células B. La actividad de fosfatasa ácida en las células T está localizada en el aparato de Golgi y presenta un patrón moteado. Este patrón enzimático característico en células T es de'' considerable importancia como un marcador específico para estas células, especialmente para linfoblastos T.''  
 La isoenzima 5 no es inhibida por el tartrato. Linfocitos activados células T, macrófagos activados, algunos histiocitos, células epitelioides, células de Gaucher, pueden tener actividad enzimática. En los linfocitos la actividad enzimática es moderada y tiene un patrón de tinción focal en o alrededor del aparato de Golgi. La existencia en sangre, de células con fuerte actividad enzimática sugiere la presencia de leucemia de células peludas.

Reactivos

Fijador:

- Buffer de citrato 0.38 mol/l pH 5.4 - - - - - 2 ml
- Agua destilada- - - - - 18 ml
- Buffer de acetato 2.5 mol/l pH 5.2- - - - - 20 ml
- Acetona - - - - - 30 ml

Colorante para la tinción:

Agua deionizada precalentada a 37°C - - - - - 46 ml  
Acido naftol AS-BI fosfórico 12.5 mg/ml en  
N,N'-dimetil formamida - - - - - 2 ml  
Buffer acetato pH 5.2 - - - - - 2 ml  
Sal Fast Garnet GBC 1 cápsula  
Filtrar en papel Whatman No. 54

Solución de contratinción:

Hematoxilina ácida pH 3.3 (se utilizó la que venía con el equipo de la casa Sigma, al igual que todos los reactivos que están incluidos en la caja de 'lymphocyte enzymes' de la casa Sigma Diagnostics.

Técnica: los frotis se fijan en la solución acetato-acetona durante 30 segundos a temperatura ambiente en una jarra coplin, se sacan y se lavan con agua deionizada y se secan al aire por 15 minutos.

Se colocan los frotis en una jarra coplin con la solución de tinción recientemente preparada (solo se utiliza una vez y se desecha), y se incuban al abrigo de la luz a 37°centígrados durante 1 hora.

Una vez concluido el tiempo, se sacan, se lavan con agua deionizada, se secan al aire 15 minutos y se colocan en la solución de hematoxilina ácida por 5 minutos. Se sacan, se lava con agua deionizada, se secan al aire y luego se monta con gelatina-glicerol y un cubre objetos para poder observar varias veces la laminilla, ya que no queda firmemente adherida al vidrio, una vez seca se observa al microscopio con objetivo de inmersión.

e). - Alfa naftil acetato esterasa (ANAE)(100). - La alfa naftil acetato esterasa es una enzima de las llamadas esterases no específicas, éstas son capaces de hidrolizar varios ésteres alifáticos y aromáticos de cadena corta. El sustrato de esta enzima es el alfa naftil acetato que al ser hidrolizado nos da lugar al ácido acético y un naftol que se acopla con una sal de diazonio para dar lugar a un azo-colorante de color café marrón insoluble en agua. Se ha observado que monocitos, granulocitos y subpoblaciones de linfocitos muestran patrones únicos de actividad de esterasa. La

reacción de esterasa no específica se utiliza más como marcador específico para monocitos y macrófagos. El método que utiliza alfa naftil acetato o alfa naftil butirato con pararrosanilina hexasotiozizada en medio ácido es el mejor para demostrar monocitos, ya que los granulocitos no son demostrables por este método... La reacción de esterasa no específica es útil en la identificación de histiocitos y monocitos, en el diagnóstico diferencial de leucemias agudas y linfoma de células grandes... Estudios inmunológicos han revelado que esta enzima está presente en los linfocitos T cooperadores.'

Reactivos

Fijador:

Buffer de citrato 0.383 mol/l - - - - - 2 ml  
 Agua deionizada - - - - - 18 ml  
 Metanol absoluto - - - - - 5 ml  
 Acetona - - - - - 27 ml

Solución de tinción:

Buffer TRIZMA pH 7.6 (maleato TRIZMA 71 mmol/l) a 37°C 50 ml  
 Fast blue RR una cápsula  
 α-naftil acetato - - - - - 20 mg  
 Etilen glicol monometil éter - - - - - 2 ml

Solución de contratinción: Hematoxilina de Mayer

Una vez secos los frotis se fijan en la solución citrato-acetona metanol durante 30 segundos a temperatura ambiente, se sacan se lavan con agua deionizada se secan al aire durante 20 minutos. Se colocan en jarras de coplin con el colorante y se incuban a 37°C al abrigo de la luz durante 30 minutos. Se sacan del colorante, se lavan con agua deionizada, se secan al aire y se contratiñe con la hematoxilina de Mayer de 5-10 minutos, se secan al aire y se montan con glicerol-gelatina para su observación al microscopio con objetivo de inmersión (101).

3.- Para todas las pruebas inmunológicas, se procedió a la toma de la muestra con una jeringa de plástico de 20 ml. con trócar de calibre 18 haciendo una punción en la cresta ilíaca de los pacientes y disolviendo la médula con 10 ml de buffer PBS y 150 U de heparina como anticoagulante, colocados en la jeringa previamente.

Para aislamiento de las células por gradiente de densidad se utilizó Ficoll-Hypaque (2.5 ml) y tres volúmenes más o menos de la muestra de médula diluida con buffer PBS.(99)

*Ficoll-Hypaque*

Ficol - - - - - 7.5 g/dl

Diatrizoato de sodio - - - - - 9.0 g/dl

*Buffer PBS*

NaCl (cloruro de sodio) - - - - - 17 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (fosfato dibásico de sodio). 7H<sub>2</sub>O- - - - - 2.35 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (fosfato monobásico de sodio). - - - - - 0.45 g

Agua c. b. p. - - - - - 2,000 ml

Ajustar el pH a 7.4 con HCl 6N.

*Agente lisante de eritrocitos:*

NH<sub>4</sub>Cl (cloruro de amonio) - - - - - 8.26 g

KHCO<sub>3</sub> (bicarbonato de potasio)- - - - - 1.00 g

E. D. T. A. tetrasódico - - - - - 0.037 g

Agua destilada - - - - - 1000 ml

La médula diluida y el Ficoll-Hypaque se colocan en uno o dos tubos de ensayo de 13 X 100 mm y se centrifuga a 400 G (aproximadamente 2,500 r.p.m.) durante 15 minutos a 10°C en centrifuga refrigerada. La interfase de células blancas se separa con una pipeta Pasteur y se lava dos a tres veces con el buffer PBS por 5 minutos cada lavada centrifugando a 300 G.(102)

Una vez terminados los lavados se resuspenden las células en PBS ajustando la concentración de células aproximadamente a  $15 \times 10^6$  / ml, con lo que para cada anticuerpo se usarán  $0.5 \times 10^6$  células aproximadamente.

Con esta suspensión se procede a la identificación de antígenos de superficie con los anticuerpos monoclonales, a la formación de rosetas 'E' con eritrocitos de carnero y/o a la prueba para la inmunoglobulina de superficie SmIg de los linfocitos B.

Todos los anticuerpos monoclonales que se usaron fueron alícuotados con anterioridad y guardados en congelación a -70°C para utilizar los grupos de tubos Eppendorf con los anticuerpos como se fueran necesitando. Para reconstituir los anticuerpos

monoclonales se usó suero fetal de ternera (12.5 ml) y buffer PBS colocando a cada tubo 600  $\mu$ l (no 500 como marca el fabricante) y tomando de éstos, 5  $\mu$ l para cada tubo, si los monoclonales eran de la casa Coulter, de lo contrario 10  $\mu$ l y llevando a 100 $\mu$ l con agua destilada.

*Método por Inmunofluorescencia.*

A cada tubo Eppendorf con un anticuerpo monoclonal dado, se le agrega 100  $\mu$ l y en algunos casos 200  $\mu$ l de la suspensión de células se agita en el vortex y se incuban 15 minutos, indistintamente a temperatura ambiente o a 4<sup>o</sup> centígrados, transcurrido el tiempo se lavan con PBS mezclando perfectamente en el vortex y centrifugando a 300 g por 2 a 3 minutos.

Luego se le agrega un antisuero anti-inmunoglobulina murina conjugado con fluoresceína (GAM-FITC) diluido con PBS en relación 1:30, la cantidad de fluoresceína diluida es de 200  $\mu$ l para cada tubo se mezcla en el vortex y se incuba 15 minutos al abrigo de la luz (también se hizo a temperatura ambiente y a 4<sup>o</sup>C).

Una vez transcurrido el tiempo se lava 2 veces con PBS centrifugando a 300 G durante 2 a 3 minutos y decantando el sobrenadante. Al precipitado de células se le agrega un agente lisante de glóbulos rojos (Lyse) preparado con PBS en relación 1:50, colocando 500  $\mu$ l a cada tubo y agregando 100  $\mu$ l de fijador (que puede ser formol), Coulter, se mezcla en el vortex y se centrifuga a 300 G por 2 a 3 minutos decantando posteriormente.

Al decantado se le agrega 1 gota de un estabilizador (Coulter) y 4 gotas de PBS, se agita en el vortex y se centrifuga a 300 g durante 2-3 minutos, se saca, se decanta, se agita en el vortex el precipitado y con pipeta Pasteur se deposita una gota en un portaobjeto, o con una pipeta automática se colocan 10  $\mu$ l de la suspensión de células, todas las veces se dejó por 24 horas en el cuarto frío y después de este tiempo se colocó sobre el portaobjetos una gota de una solución de PBS-glicerol (1 ml PBS y 9 ml de glicerol) y luego el cubreobjetos, sobre éste se agregó una gota de aceite de inmersión y se observó al microscopio de inmunofluorescencia (epi-iluminación) contando 100 células. (103,104,105)

#### 4.-Rosetas E con eritrocitos de carnero.

Se lavan eritrocitos de carnero frescos 3 veces con PBS centrifugando a 400 G durante 5 minutos cada vez, después de la última lavada se resuspenden los eritrocitos en PBS a una concentración de 1% (volumen de paquete-volumen de PBS).

En un tubo de plástico de 12 X 75 mm se depositan 200 µl de la suspensión de células y 200 µl de la suspensión de eritrocitos de carnero, se mezcla y se incuba durante 30 minutos a 37°C transcurrido el tiempo se saca de la incubación y se centrifuga a 220 G para promover el contacto entre células.

Inmediatamente después se incuba a 4°C y después de 1 hora se observa al microscopio contando las rosetas que se encuentren en 200 células (se resuspende el botón de células, se coloca una gota en un portaobjetos, se cubre y se observa con objetivo de inmersión). Siempre se dejó un tubo por 24 horas a 4°C. Consideramos roseta al encontrar 1 mononuclear con 3 o más eritrocitos de carnero pegados (106,107).

#### 5.- Identificación de inmunoglobulina de superficie Sigm.-

\*Descubrimientos recientes han mostrado que la expresión de inmunidad celular y humoral reside en dos poblaciones de linfocitos que se originan en el timo (linfocitos T) y médula ósea (linfocitos B). Estas células tienen efecto modulador y efector en varias subpoblaciones caracterizadas por marcadores de superficie específicos.

Los receptores, antígenos y rosetas de eritrocitos, representan 3 categorías de marcadores de superficie. Los receptores enlazan ligandos tales como las inmunoglobulinas (Ig) y complemento, mientras que los antígenos son reconocidos por anticuerpos dirigidos contra antígenos expuestos en la superficie celular. Los eritrocitos de carnero forman rosetas espontáneamente con los linfocitos T y los eritrocitos de ratón con los linfocitos B.

Los linfocitos B maduros son reconocidos por receptores para el virus Epstein-Barr, receptores Fc, rosetas con eritrocitos de carnero cubiertas con Ig y complemento y por la presencia de inmunoglobulinas de superficie (Sig). Las primeras células pre-B

aparecen en el hígado y la expresión de Ig es intracitoplásmica, en este estadio de diferenciación no son demostrables las inmunoglobulinas. Los linfocitos B expresan SIgM y no otras inmunoglobulinas que se desarrollan antes que estas células las expresen como IgA, IgG, e IgD. SIgD aparece exclusivamente en los linfocitos B inmaduros que también llevan IgM. Las células SIgM + son importantes pues inhiben el desarrollo y previenen la aparición de otros isotipos de células B.

\* Tomado del inserto B-Lymphocytes de Sigma Diagnostics No.95

Reactivos:

Anticuerpo conjugado de fosfatasa alcalina intestinal de ternera amortiguado a pH 8 con 0.02% de azida de sodio.

Buffer TRIZMA - - - - - 2 ml

Indicador SIg-sal Fast violet B- - - - - 0.03%

Naftol AS-TR ácido fosfórico - - - - - 0.1%

Indicador de peroxidasa 2,7-diaminofluoreno 0.67% (con éter monometil etilen glicol).

Una vez separadas las células por el gradiente de Ficoll-Hypaque, lavadas 2 veces con PBS se ajusta la suspensión de células a  $6-7.5 \times 10^8$  /ml.

Si incuban 100  $\mu$ l de la suspensión de células con 30  $\mu$ l de anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina durante 30 minutos a 2-8°C.

Transcurrido el tiempo se saca y se lava con buffer TRIZMA o en su defecto PBS centrifugando a 400 G por 10 minutos, decantando el sobrenadante. Se agregan 500  $\mu$ l de indicador SIg (disuelto con 2 ml de TRIZMA) y se incuba 30 minutos a 37°C protegido de la luz.

Al terminar la incubación se homogeniza y con pipeta Pasteur se toma una muestra, se coloca entre porta y cubre y con aceite de inmersión se observa al microscopio contando 100-200 células y se determina el porcentaje de células positivas que son las que presentan un color rojo casi siempre como punteado.

## X. -RESULTADOS

Se probó la formación de rosetas E con eritrocitos de carnero en las 32 muestras de médula ósea, resultando 22 negativas y las 10 que dieron positivas son: 3 T, 2 CALLA, 2 T y B, 1 B T y M, 1 Pre B y 1 M7.

En lo referente a la prueba de Inmunoglobulina de superficie SIgM solo se probaron 16 muestras ( porque no teníamos reactivo), con los resultados siguientes: 13 negativas y positivas fueron 1 T, 1 CALLA y 1B T y M.

En las siguientes tablas, gráficas y fotografías se consignan los resultados obtenidos en las pruebas realizadas con la metodología descrita, adicionando una tabla y una gráfica con los datos que presentaron los niños al ingresar al Instituto Nacional de Pediatría, los cuales se consideran como factores de riesgo (Tabla y gráfica No. 1).

Los resultados de la clasificación morfológica se encuentran representados en la tabla y gráfica No. 2.

Los resultados de las tinciones citoquímicas están agrupados en la tabla y gráfica No. 3, anotando en las tablas 4 y 5 los resultados por separado para fosfatasa ácida de Schiff y fosfatasa ácida.

Los resultados de los marcadores para leucemia aguda linfocítica están agrupados en la tabla No. 6, para leucemia aguda mielocítica en la tabla No. 7 y en la tabla No. 8 y gráfica No.4 se encuentran el diagnóstico del inmunofenotipo.

La correlación entre morfología y citoquímica está reportada en la tabla No. 9 y representada en la gráfica No. 5, morfología e inmunofenotipo está reportada en la tabla No. 10 y representada en la gráfica No. 6 y la correlación entre citoquímica e inmunofenotipo está reportada en la tabla No. 11 y representada en la gráfica No. 7.

## LISTA DE TABLAS Y GRAFICAS

*Tabla No. 1 Factores de riesgo, están considerados como tales la edad, el sexo y el número de leucocitos. Los datos están tomados del expediente y la gráfica No. 1 nos muestra el número de pacientes que de acuerdo a la edad y el número de leucocitos al ingreso caen en los grupos de mayor o menor riesgo.*

*La tabla No. 2 y la gráfica No. 2 representan los resultados del diagnóstico morfológico, el cual como ya se indicó se realizó siguiendo los lineamientos del grupo FAB (Apéndice A).*

*Las tablas Nos. 3, 4 y 5 representan los diferentes resultados de las tinciones citoquímicas, la gráfica No. 3 nos muestra la distribución de los resultados por grupos de edad.*

*Las tablas Nos. 6, y 7 presentan los resultados a los marcadores de superficie por inmunofluorescencia y la tabla No. 8 y la gráfica No. 4 nos presentan el resultado de la clasificación por inmunofenotipo.*

*Las tablas Nos. 9, 10 y 11, así como las gráficas Nos. 5, 6 y 7 nos presentan la correlación ó correspondencia que existe entre los tres métodos de diagnóstico para las leucemias, morfología, citoquímica e inmunofenotipo.*

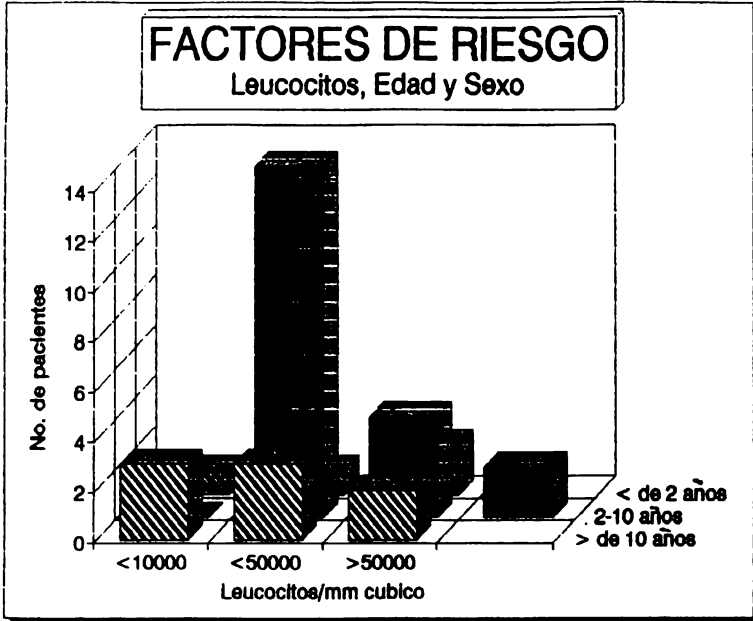
Tabla No. 1

## FACTORES DE RIESGO

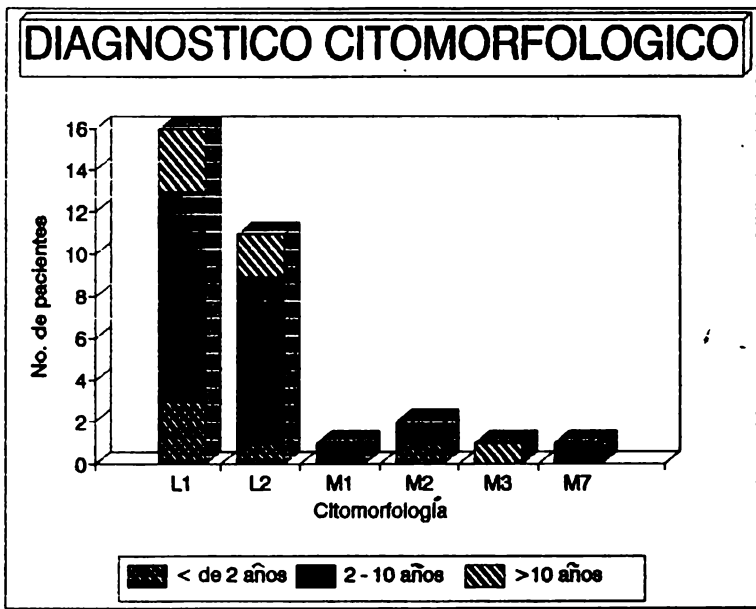
EDAD AÑOS	LEUCOCITOS AL INGRESO			SEXO		SUBTOTAL
	<10,000	10,000-50,000	>50,000	M	F	
< DE 2	1	1	2	1	3	4
2-10	14	4	2	11	9	20
>10	3	3	2	3	5	8
TOTAL	18	8	6	15	17	32

Dentro de los factores de riesgo se toman en cuenta con mayor frecuencia: edad, sexo y el número de leucocitos al ingreso.

El factor raza ya se ha indicado que aún cuando se considera como predisponente a la leucemia (mayor frecuencia en blancos que -- en negros)(99), en el presente caso se ha tomado a todos los niños estudiados como raza mestiza ya que aún cuando los pacientes son de diferentes estados de la república, ninguno es de una etnia pura, de las diferentes que aún existen en México.



Gráfica No. 1



Gráfica No. 2

Tabla No. 2

DIAGNOSTICO CITOMORFOLOGICO								
EDAD AÑOS	DIAGNOSTICO CITOMORFOLOGICO F.A.B.							TOTAL
	L1	L2	M1	M2	M3	M7		
	M	F	M	F	M	F	M	F
<2	1-2	1-0	0-0	0-1	0-0	0-0	0-0	2-3
2-10	7-3	3-5	1-0	0-1	0-0	0-1	11-10	
>10	1-2	1-1	0-0	0-0	1-0	0-0	3-3	
TOTAL	9-7	5-6	1-0	0-2	1-0	0-1	16-16	

El diagnóstico citomorfológico fue realizado en el servicio de hematología, teniendo los frotis con Wright.

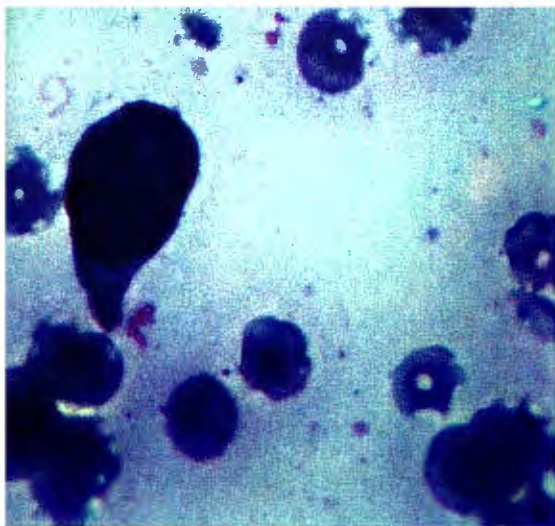
La clasificación morfológica se obtuvo siguiendo los lineamientos marcados por el grupo Franco-Americano-Británico (FAB). Los resultados aquí representados fueron tomados del expediente de cada uno de los pacientes, consultado en el archivo clínico.

## FOTOGRAFÍAS

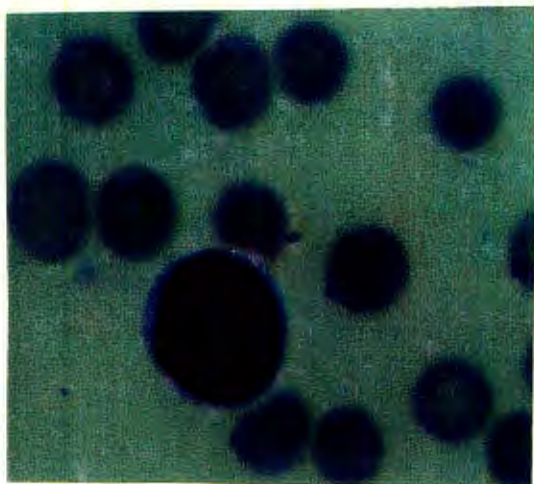
Las fotografías Nos.1 y 2 nos muestran diferentes blastos de frotis de pacientes de este estudio, teñidos con Wright.- a. Blasto en espejo de mano que algunas veces se encuentra en las leucemias tipo L1.-b. Un blasto que cumple las características del tipo L2.- c. Blastos con rasgos mieloides que caracterizan a la leucemia M2.- d. grupo de células con blastos de leucemia M3.-e. Blastos característicos de leucemia M4 (mielomonocitoide).- f. Conjunto de células en las cuales se observan blastos con pseudópodos (con puentes entre sí) y abundantes plaquetas, muy sugerente de leucemia M7.

La fotografía No. 3 nos muestra 6 frotis de médula ósea con diferentes tinciones citoquímicas, también pertenecen al grupo de pacientes estudiados.- a. Un blasto con granulación verde-azul, lo que nos indica positividad a la mieloperoxidasa.- b. Blastos con granulación negruzca, indicativo de positividad al negro Sudán.- c. Blastos con granulación polar, positivos para fosfatasa ácida.- d. Blastos con positividad granular para la fosfatasa ácida.- e. Blastos con coloración característica de la fosfatasa ácida de Schiff.- f. Blastos con coloración pardo rojiza, característica de la tinción de alfa-naftil-acetato-esterasa.

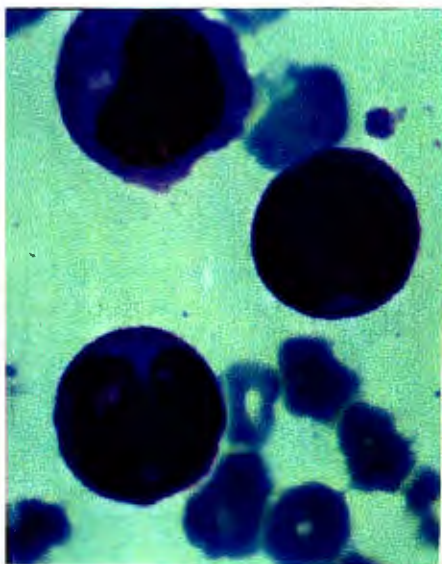
La fotografía No. 4 nos muestra los tres tipos de respuesta positiva que podemos observar en las pruebas inmunológicas.- a. Formación de rosetas 'E' con eritrocitos de carnero.- b. Positividad a la inmunoglobulina de superficie SIGM de los linfocitos B.- c. Marcadores de superficie al microscopio de inmunofluorescencia.



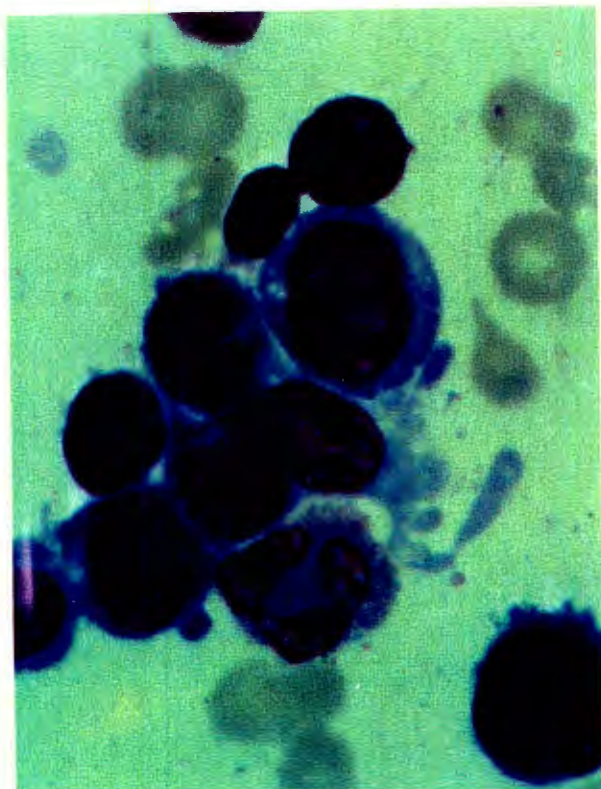
A.- BLASTO L1 EN ESPEJO DE MANO



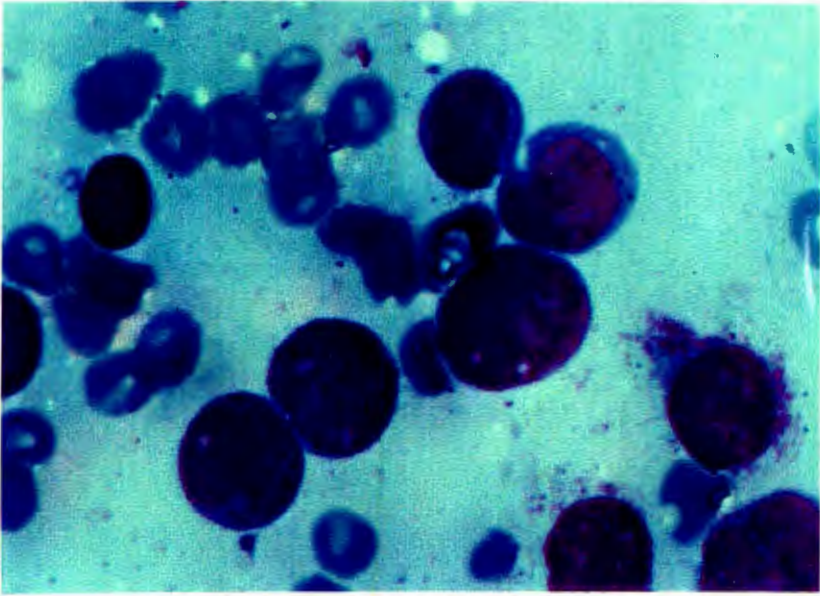
B.- BLASTO L2



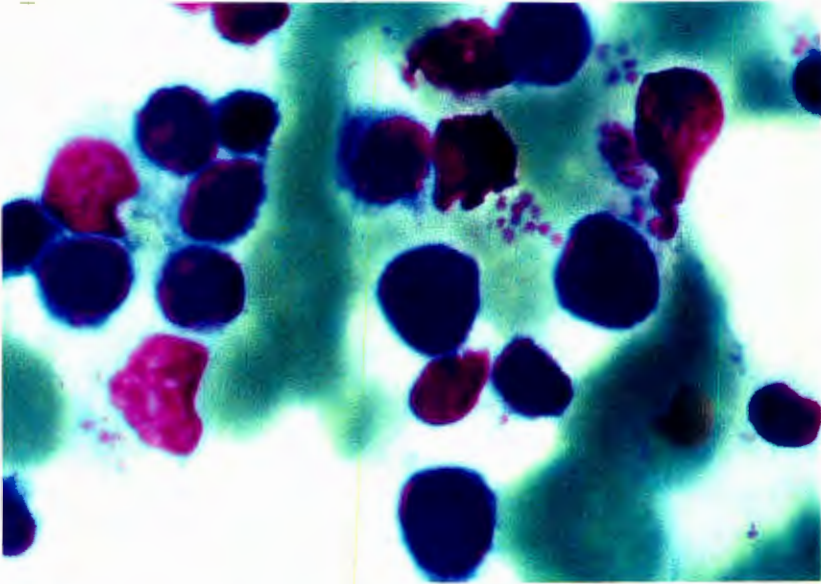
C.- BLASTOS M2



D.- BLASTOS M3



E.- BLASTOS M4



F.- BLASTOS M7

En lo que se refiere a diagnóstico citológico, se considera positivo cuando se observa la coloración característica en 3% ó más de blastos tanto para la tinción de Mieloperoxidasa como la de Negro Sudán.

Para las dos tinciones citológicas anteriores se observó un patrón de positividad solamente en las leucemias mieloides, con lo que se cumple lo referido en la literatura (22). Según Hoyle y Cols. (23), la positividad al Negro Sudán es importante para la inducción a la remisión, la respuesta al tratamiento y la supervivencia de los pacientes.

Los resultados de la tinción de fosfatasa ácida de Schiff (PAS) y fosfatasa ácida se cuentan considerando el tipo de granulación, en la tinción de PAS se dan valores de alto intermedio y bajo (cuadro No. 4) y en el caso de fosfatasa ácida se consideran positivos todos, diferenciando entre positividad polar o granular (cuadro No. 5).

En el caso de alfa-naftil-acetato esterasa, se considera positiva una tinción cuando 3% o más de blastos presenta la granulación característica negro-rojizo.

Todos los resultados de las pruebas citológicas se encuentran agrupados por edad y sexo en el cuadro No. 3 y la gráfica correspondiente; además los patrones característicos se pueden observar en las fotografías tomadas de los frotis de algunos de los pacientes estudiados.

**Tabla No. 3**  
**CITOQUIMICAS**

Edad Años	MPO M-F	MS M-F	PAS M-F	F.AC. M-F	A.N.A.E M-F
<2	1-0	1-0	2-2	2-2	1-1
2-10	0-2	0-2	11-10	11-10	1-1
>10	1-2	1-2	3-4	3-4	0-0

Clasificación citoquímica por edad y sexo.

Todas las tinciones se hicieron en frotis de médula ósea según las técnicas descritas en material y métodos.

**Tabla No. 4**

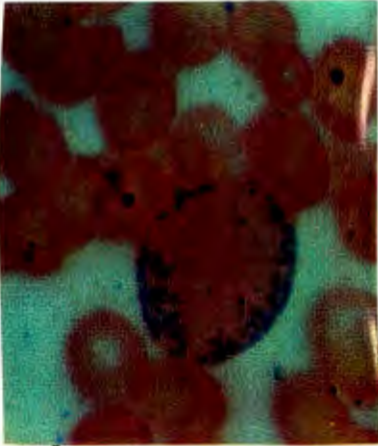
FOSFATASA ACIDA DE SCHIFF				
INMUNO-FENOTIPO	BAJO	INTER-MEDIO	ALTO	TOTAL
PRE-B TEMP	1	0	1	2
COMUN	8	8	1	17
T	3	1	0	4
T y B	2	0	0	2
B T y M	1	0	0	1
M	3	2	1	6
Total	18	11	3	32

Algunos autores consideran de interés el grado de positividad en la tinción de PAS por lo que se reporta como bajo - intermedio y alto

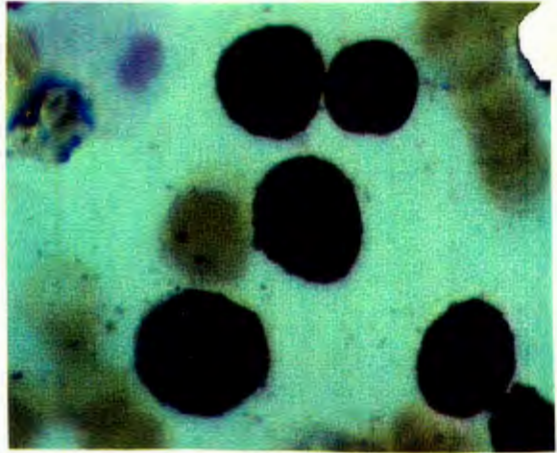
**Tabla No. 5**

FOSFATASA ACIDA							
POSITIVO	INMUNOFENOTIPO						TOTAL
	PRE-B	COMUN	T	T y B	B T y M	M	
No polar	2	17	4	2	1	6	32
Polar	0	1	3	0	0	0	4

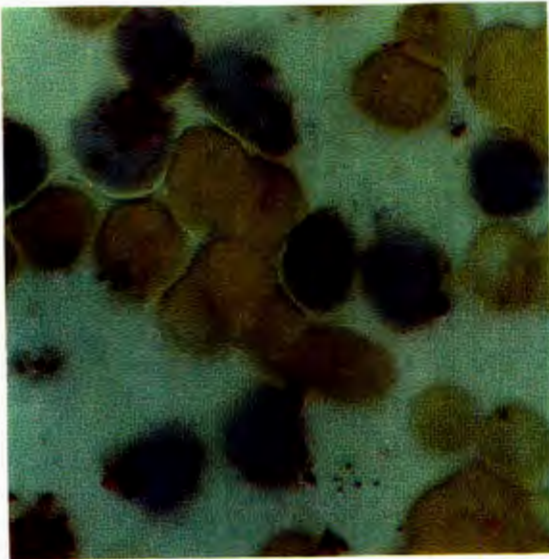
Se considera que las Leucemias de células T presentan positividad polar, todos los otros fenotipos son positivos en forma granular.



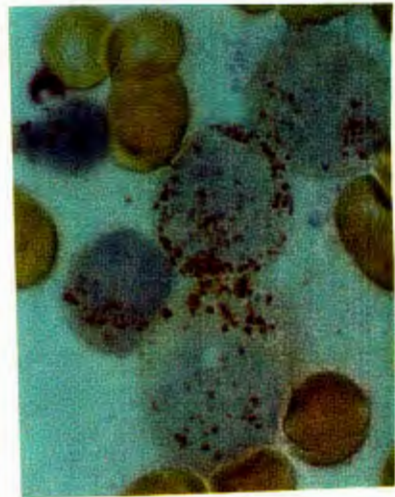
A.- MIELOPEROXIDASA



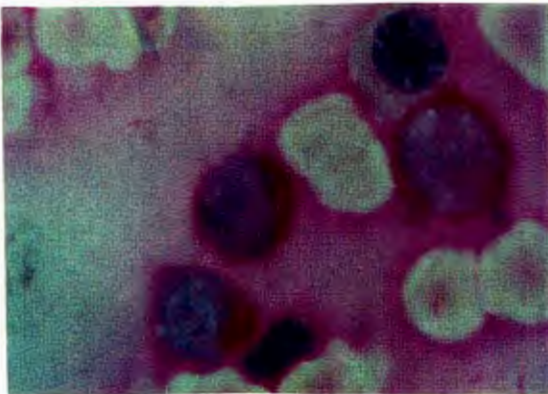
B.- NEGRO SUDAN



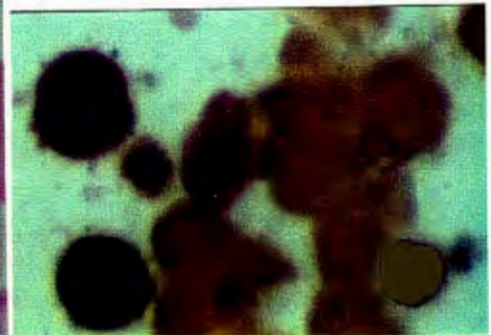
C.- FOSFATASA ACIDA (POLAR)



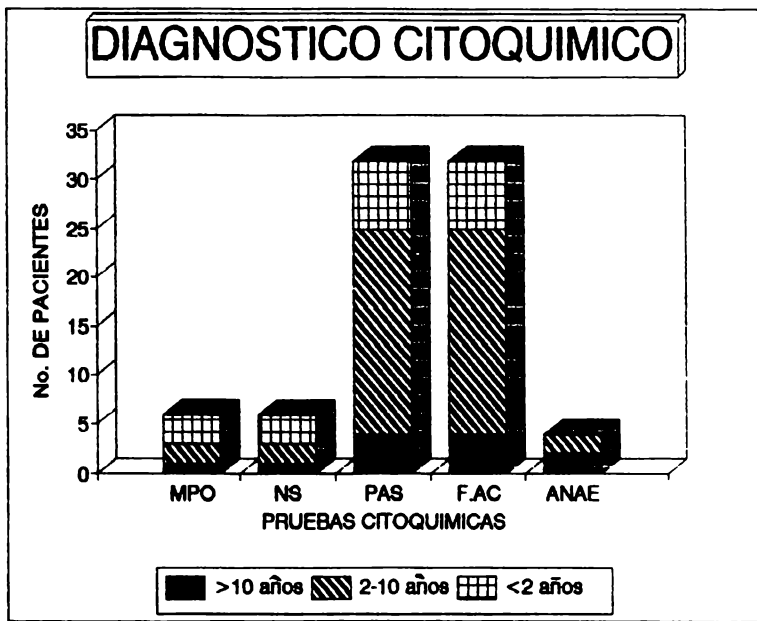
D.- FOSFATASA ACIDA (GRANULAR)



E.- FOSFATASA ACIDA DE SCHIFF

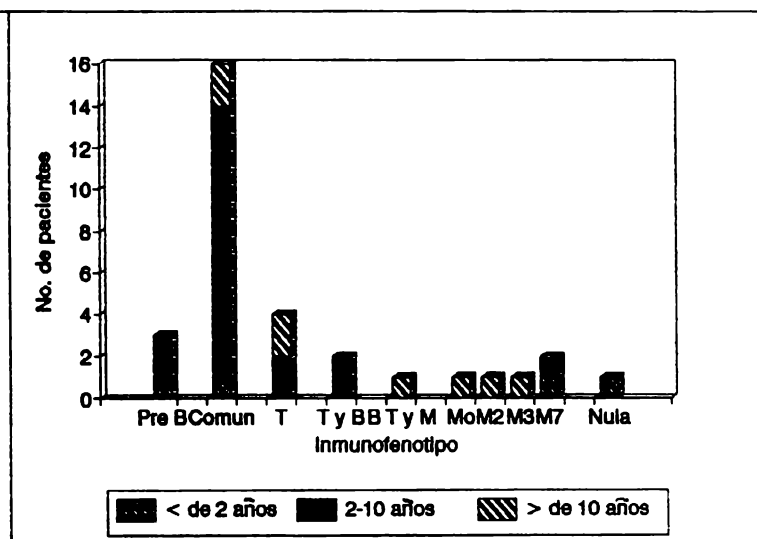


F.- ALFA NAFTIL ACETATO ESTERASA



Gráfica No. 3

## DIAGNOSTICO POR INMUNOFENOTIPO



Gráfica No. 4

**Tabla No. 6**  
**MARCADORES DE LEUCEMIA AGUDA LINFOCITICA**

EDAD AÑOS	DR	CD <sub>10</sub>	CD <sub>20</sub>	CD <sub>21</sub>	CD <sub>19</sub>	CD <sub>5</sub>	CD <sub>7</sub>	CD <sub>4</sub>	CD <sub>2</sub>	CD <sub>8</sub>
	M-F	M-F	M-F	M-F	M-F	M-F	M-F	M-F	M-F	M-F
< 2	1-2	1-1	1-2	0-0	0-1	0-0	0-0	0-0	1-0	0-0
2-10	0-7	10-5	2-0	1-0	9-5	2-4	0-2	1-2	4-2	1-0
>10	3-2	2-1	1-0	0-0	2-1	0-3	0-2	1-0	0-2	0-1

**Tabla No. 7**  
**MARCADORES DE LEUCEMIA AGUDA MIELOCITICA**

EDAD AÑOS	μ	CD <sub>14</sub>	CD <sub>14b</sub>	CD <sub>13</sub>	M <sub>40</sub>	CD <sub>33</sub>	CD <sub>34</sub>	CD <sub>21</sub>	6F	1B	III <sub>10</sub> / III <sub>1a</sub>	III <sub>1a</sub>	FVI II
	M-F	M-F	M-F	M-F	M-F	M-F	M-F	M-F	M-F	M-F	M-F	M-F	M-F
<2	0-1	0-1	0-1	0-0	0-0	1-0	0-2	1-0	0-0	1-0	0-1	0-0	1-0
2-10	3-1	0-1	0-1	0-1	0-0	0-1	3-2	0-0	0-0	0-1	0-1	0-1	0-1
>10	0-0	0-0	0-0	1-2	1-0	0-1	1-1	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0

Nota.- El anticuerpo monoclonal μ se considera positivo >10%.  
Para todos los otros anticuerpos monoclonales se toma por positivo >30%.

**Tabla No. 8**  
**DIAGNOSTICO POR INMUNOFENOTIPO**

EDAD AÑOS	PDE-B TERP.	COMUN	T	T v B	B T v M	M <sub>0</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>7</sub>	NUL A
	M-F	M-F	M-F	M-F	M-F	M-F	M-F	M-F	M-F	M-F
<2	1-0	0-1	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0	1-0	0-1
2-10	1-1	0-5	1-1	1-1	0-0	0-0	0-0	0-0	0-1	0-0
>10	0-0	2-0	0-2	0-0	0-1	0-1	0-1	1-0	0-0	0-0
TOTAL	2-1	10-6	1-3	1-1	0-1	0-1	0-1	1-0	1-1	0-1

En base a la clasificación inmunológica se dividen los pacientes en positivos o negativos según el porcentaje observado de los marcadores de superficie: para el monoclonal  $\mu$  se considera positivo con 10% ó más, todos los otros marcadores deben tener 30% ó más. Para clasificar a una leucemia como nula, todos los marcadores de superficie debe dar negativo o tener positividad el DR ó HLA-DR.

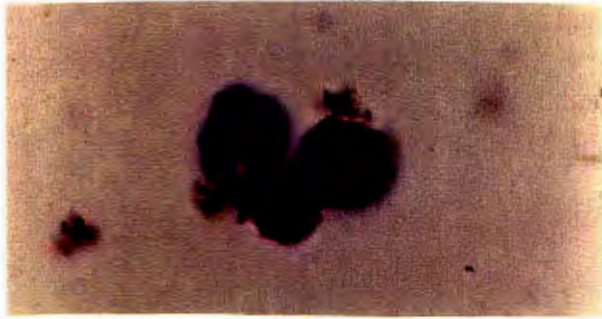
Los subgrupos inmunológicos se clasificaron de acuerdo a los criterios de Nadler y Cols. (108) en:

Estadio de célula B precursora	Inmunofenotipo
I	DR
II	DR, CD19
III	DR, CD19, CD10
IV	DR, CD19, CD10, CD20

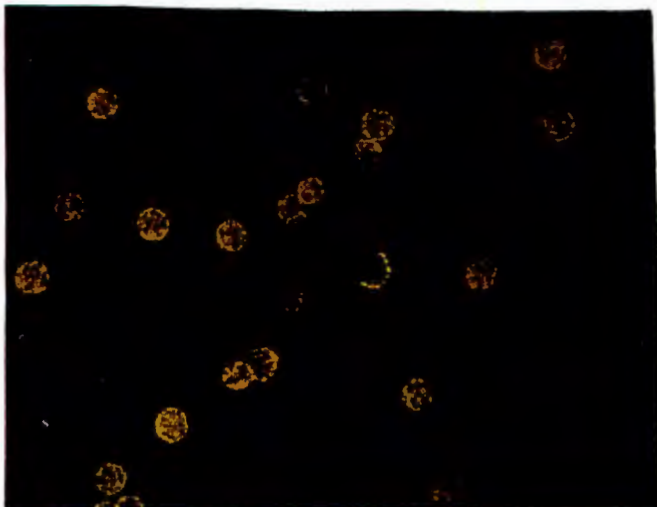
Todos los resultados del inmunofenotipo están anotados en los cuadros 6 y 7 y el diagnóstico final entregado a los médicos está indicado en el cuadro 8 y la gráfica respectiva, el patrón de positividad es similar para todos los marcadores y se encuentra representado en la fotografía tomada al microscopio de inmunofluorescencia.



A.- ROSETAS "E" CON ERITROCITOS DE CARNERO



B.- SIGM INMUNOGLOBULINA DE SUPERFICIE



C.- MARCADORES DE SUPERFICIE POR INMUNOFLORESCENCIA

**Tabla No. 9**  
**MORFOLOGIA Y**  
**CITOQUIMICA**

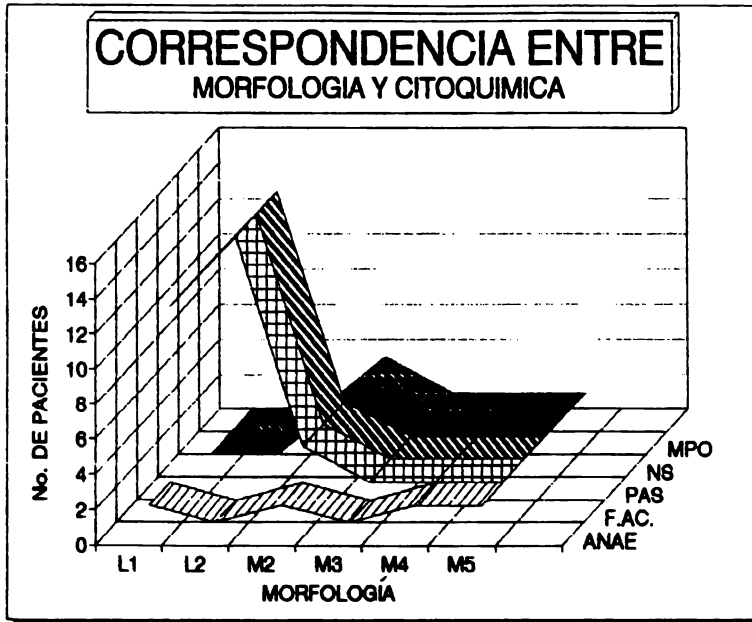
	L1	L2	M2	M3	M4	M5
<b>MPO</b>	0	0	3	1	1	1
<b>NS</b>	0	0	3	1	1	1
<b>PAS</b>	11	15	3	1	1	1
<b>F.Ac</b>	11	15	3	1	1	1
<b>ANA-E</b>	1	0	1	0	1	1

**Correlación entre morfología  
y citoquímica**

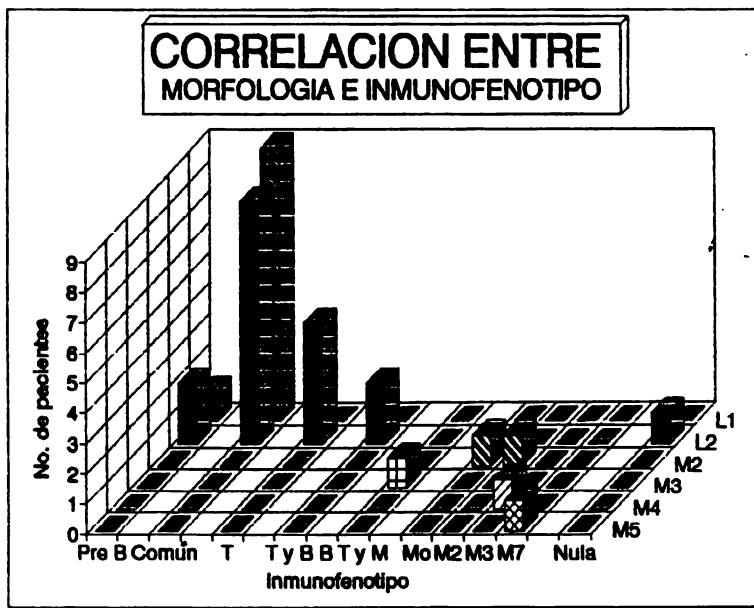
**Tabla No. 10**  
**MORFOLOGIA E**  
**INMUNOFENOTIPO**

	L1	L2	M2	M3	M4	M5
<b>Pre-B</b>	1	1	0	0	0	0
<b>Común</b>	9	8	0	0	0	0
<b>T</b>	0	4	0	0	0	0
<b>B<sub>y</sub> T</b>	0	2	0	0	0	0
<b>BT<sub>y</sub>M</b>	0	0	0	1	0	0
<b>Mo</b>	0	0	1	0	0	0
<b>M2</b>	0	0	1	0	0	0
<b>M3</b>	0	0	0	0	1	0
<b>M7</b>	0	0	0	0	0	1
<b>Nula</b>	0	1	0	0	0	0

**Correlación entre morfología  
e inmunofenotipo**



Gráfica No. 5



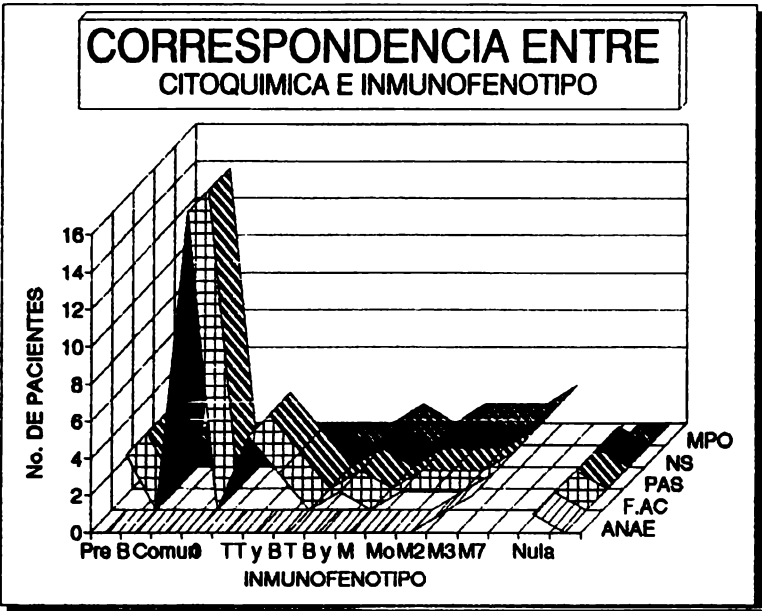
Gráfica No. 6

Tabla No. 11

**INMUNOFENOTIPO Y CITOQUIMICA**

	Pre-B	Común	T	TyB	BTyM	Mo	M2	M3	M7	Nula
<b>MPO</b>	0	0	0	0	1	1	1	1	2	0
<b>NS</b>	0	0	0	0	1	1	1	1	2	0
<b>PAS</b>	3	16	4	2	1	1	1	1	2	1
<b>F.Ac.</b>	3	16	4	2	1	1	1	1	2	1
<b>ANAE</b>	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1

**Correlación entre inmunofenotipo y  
citoquímica**



Gráfica No. 7

## XI. - DISCUSION Y CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados para este trabajo:

- 1.- Realizar la clasificación citomorfológica e inmunofenotípica de leucemia aguda en niños mexicanos y
- 2.- Definir los patrones citoquímicos para cada uno de los tipos de leucemia aguda diagnosticada.

Estos se cumplieron, ya que como se ha señalado, siguiendo las indicaciones del grupo FAB (3,4,7 y 10) se procedió a la clasificación morfológica, según está reportado.

Con los anticuerpos monoclonales que tuvimos a disposición durante el tiempo que duró el trabajo experimental, se procedió según la literatura consultada, por diversos autores( 48 a 69) y de acuerdo a las indicaciones que fueron dadas en el laboratorio, a trabajar con las muestras de médula ósea ya fuera de piso, cuando el paciente estaba hospitalizado o de consulta externa, si las condiciones del paciente le permitían ser ambulatorio.

Todas las muestras fueron procesadas según la metodología descrita, que si bien en muchos casos no es muy ortodoxa, es la que ha dado resultados satisfactorios en 6 u 8 años que la manejan en el laboratorio de Hematología del Instituto Nacional de Pediatría.

En lo referente a los patrones citoquímicos que se pretendían definir, solamente se corroboró lo señalado por los diferentes autores consultados (13,18 a 25) ya que encontramos que todas las leucemias independientemente de la clasificación morfológica o inmunofenotípica fueron positivas a la coloración de PAS (fosfatasa ácida de Schiff) y a la fosfatasa ácida.

Es importante notar que de acuerdo a Savage (32) la positividad de la fosfatasa ácida en forma polar es característica de la leucemia Aguda de células T y de las 4 Leucemias de células T que encontramos 3 presentaron positividad polar y una bifenotípica T y B también la presentó, en cambio las otras 28 fueron positivas a la fosfatasa ácida en forma granular.

Este resultado coincidió con una positividad superior al 20% (límite marcado por el propio laboratorio) en la formación de rosetas E con eritrocitos de carnero. Las otras leucemias que formaron rosetas y se reportaron como positivas tenían menos de 20%,

y fueron 2 CALLA ( común), 1 B T y M (trifenotípica), 1 Pre-B y una M7, lo cual se explica como residuos de células T de la médula ósea según observaciones de la morfología.

Por lo que se refiere a los patrones de positividad de PAS, de acuerdo con algunos autores (19) no representa mayor diferencia el que sean bajos, intermedios o altos, ya que tanto 1 Pre-B como 1 CALLA, y 1 M3 fueron altos, la mayor parte de leucemia común presentó un patrón intermedio, así como 1 M7, 1 Nula y 1 T, las otras 26 presentaron un patrón bajo. Sería necesario seguir el curso de la terapia que se aplique a los niños con leucemia, realizando cada vez que se presenten a consulta nuevos frotis y tinciones y de esta manera quizá saber si, la edad, tipo de leucemia y tratamiento cambian los patrones de positividad de la tinción del ácido peryódico de Schiff.

En lo referente a la tinción de la Peroxidasa, solamente las leucemias M dieron positivo, cumpliéndose lo referido en la literatura como tinción diferencial para este tipo de leucemias(22). El patrón de inclusión para considerar positiva una tinción de peroxidasa fué de >3% de blastos +, según referencia del Dr. Paredes de 4-15% puede ser mielóide con componente linfóide.

Por lo que se refiere a la tinción con Negro Sudán también se presentó el mismo patrón de positividad que la peroxidasa, las leucemias mieloides fueron las únicas positivas. en este caso también se sigue el patrón de > 3% de blastos positivos.

Según Hoyle et al. (23) la positividad al sudán negro es importante para la inducción a la remisión y la respuesta al tratamiento y la sobrevivencia de los pacientes, una positividad débil predice duración en la remisión, y si es fuerte la remisión será corta y el paciente puede presentar hemorragias (y/o CID) y morir. Por eso sugiero que se siga el tratamiento de los pacientes con las tinciones citoquímicas.

Con la tinción de alfa-naftil-acetato-esterasa solamente encontramos 4 positivo débil: 1 M7 con < de 20%, 1 M3, 1M7 y 1 nula con > de 20%, la tinción se considera específica para M4 y M5, lo que hace suponer que posiblemente algunas células de la médula se

tiñeron dando esa positividad o que estuviera enmascarado por el inmunofenotipo M3 o M7 un componente monocítico, así como en la nula.

En cuanto a la hipótesis enunciada, ésta se cumple, porque no se encontraron diferencias entre lo reportado en la literatura en relación a las razas blanca, negra o amarilla, y los niños mexicanos como raza mestiza presentan los mismos patrones citoquímicos y de inmunofenotipo que todos los otros niños del mundo.

En cuanto a los factores de riesgo, se necesita un estudio muy largo para poder evaluar correctamente, los hábitos de las familias y las relaciones con su entorno, se presume que, al ser familias de estatus socioeconómico medio-bajo (según los datos encontrados en el expediente), están más en contacto con productos químicos como insecticidas, herbicidas y otros que pueden ser factores predisponentes al padecimiento, sin embargo son suposiciones solamente y para comprobarlo, es necesario realizar un estudio prospectivo y retrospectivo a largo plazo.

En conclusión, los estudios realizados tienen validez desde el punto de vista que contribuyen a mejorar el grado de supervivencia de los niños que padecen leucemia; sin embargo es un estudio muy caro y por lo tanto no es fácil de implementar en cualquier región de la República. Por otra parte con una buena observación de la morfología y las tinciones citoquímicas bien estandarizadas, es posible lograr hasta un 95% de certeza en el diagnóstico.

## XII. - BIBLIOGRAFIA

1. - *Wiale John B. Hematology :Laboratory Medicine. 5a. ed. C.V. Mosby Co.1977.-Cap.16 pp 822-839.*

2. - *Williams J. Williams. Hematología.- 1a. Ed. 1975. Reimpresión 1979. Ed. Salvat.- Tomo I, sección 7, Cap. 79 pp 687.*

3. - *Bennett J.M., D. Catovsky, M.T. Daniel, G. Flandrin, D.A.G. Galton, H.R. Gralnick and C. Sultan.- Proposal for the classification of the acute leukaemias.- British Journal of Haematology 33:451-458.1976.*

4. - *Gralnick H. R., D.A.G. Galton, D. Catovsky, C. Sultan and J. M. Bennett.- Classification of acute leukemia. Ann. of Int. Med. 87:740-753. 1977.*

5. - *Schier Stanley L. Scientific American. 14 Hematología. VIII Leucemias y Trastornos mieloproliferativos. pp 1-28.1987.*

6. - *Champlin R., D.W. Golde.- Principios de Medicina Interna de Harrison 12ava. Edición 1991. Ed. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C. V. Vol. II cap. 296 pp 1800-1810.*

7. -*Bennett J.M., D. Catovsky, M.T. Daniel, G. Flandrin, D.A.G. Galton, H.R. Gralnick and C. Sultan.- Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). Ann of Internal Med. 103: 460-462. 1985.*

8. -*Malkin David and M.H. Freedman.- Childhood Erythroleukemia: Review of Clinical and Biological Features.. The Am. Jour. of Ped. Hematology/Oncology. 11;3: 348-359. 1989.*

9. -*Rapaport Samuel I. Introducción a la Hematología. 2a. Ed. Ed. Salvat. Cap. 15 pp 233-235.*

10. -*Bennett J.M., D. Catovsky, M.T. Daniel, G. Flandrin, D. Galton, H. Gralnick and C. Sultan.- Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia (a report of FAB group). Ann of Int. Med. 103: 626-629. 1985.*

11. - *Escamilla G. Guillermo.- Comunicación Personal.*

12. - *Hollstein Monica, D. Sidransky, B. Vogelstein and C.C. Harris.- p53 Mutations in Human Cancers.-Science 253: 49-53. 1991.*

- 13.- Altman Arnold J.- Cytologic diagnosis of the acute nonlymphoid leukemias. 'Morphologic, cytochemical and ultrastructural features'. -The Am. Jour. of Ped. Hematology/Oncology 7;1: 21-44. 1985
- 14.- Stein Preston, S. Peiper, D. Butler, S. Melvin, D. Williams and S. Stass.- Granular acute lymphoblastic leukemia. - Am. Jour. of Clin. Pathol. 79;4: 426-430. 1983.
- 15.- Wick Mark R., Ch. Y. Li and R. V. Pierre.- Acute nonlymphocytic leukemia with basophilic differentiation. - Blood 60;7: 38-46. 1982
- 16.- Poplack David G. y G. Reaman.- Leucemia Linfoblástica aguda en la Infancia. - Clínicas Pediátricas de Norte América. Vol. 4 Leucemias. pp 980.
- 17.- Altman Arnold J., Cytologic diagnosis of the acute nonlymphoid leukemias 'Flow cytometry, surface markers, cytogenetics and use of cell culture techniques The Am. Jour. of Ped. Hematology/Oncology 7;2: 156-164. 1985
- 18.- McKenna Robert, J. Kersey, R. Brynes, E. Spanjers, M.E. Nesbit, R.D. Brunning and C. D. Bloomfield.- Cytochemical profile in acute lymphoblastic leukemia. Am. Jour. of Ped. Hematology/Oncology 1;1: 263-275. 1979.
- 19.- Humphrey G.B., M.E. Nesbit and R.D. Brunning.- Prognostic value of the periodic acid-Schiff (PAS) reaction in acute lymphoblastic leukemia. Am. Jour. of Clin. Pathol. 61: 393-397. 1974.
- 20.- Hayhoe F.G.J., D. Quaglino and R.J. Flemans.- Consecutive used of Romanowsky and Periodic-Acid-Schiff techniques in the study of blood and bone-marrow cells. British Jour. of Haemat. 6: 23-33. 1960.
- 21.- Quaglino D. and F.G.J. Hayhoe.- Periodic-Acid-Schiff positivity in erythroblasts with special reference to Di Gugliemo's disease. -British Jour. of Haematol. 6: 26-33 1960.
- 22.- Kaplow Leonard S.- Simplified myeloperoxidase stain using benzidine dihydrochloride. Blood 26;2: 215-218. 1965
- 23.- Hoyle C.F., R.G. Gray, K. Wheatley, D. Swirsky, M. de Bastos, P. Sherrington, J.K. Rees and F.G. Hayhoe.- Prognostic

importance of Sudan Black positivity: a study of bone marrow slides from 1986 patients with de novo acute myeloid leukaemia. - *British Jour. of Haematol.* 79: 398-407. 1991.

24. - Rozenszajn L., M. Leibovitch, D. Shosam and J. Epstein. - The esterase activity in megaloblasts, leukaemic and normal haemopoietic cells. - *British Jour. Haematol.* 14: 605-610. 1968.

25. - Knowles D.M., T. Hoffman, M. Ferrarini and H.G. Kunkel. - The demonstration of acid alpha naphthyl esterase activity in human lymphocytes: usefulness as a T-cell marker. - *Cellular Immunology* 35: 112-123. 1978.

26. - Palacios R., D. Alarcón S., L. Llorente, A. Ruiz A. and E. Díaz J. - Human post-thymic precursor cells in health and disease. I Characterization of the autologous rosette-forming T cells as post-thymic precursors. *Immunology* 42: 127-135. 1981.

27. - Ranki Annamari. - Nonspecific esterase activity in human lymphocytes. 'Histochemical characterization and distribution among major lymphocyte subclasses'. - *Clin. Immun. and Immunopathol.* 10: 47-58. 1978.

28. - Zicca A., A. Leprini, A. Cadoni, A.T. Franzi, M. Ferrarini and C.E. Grossi. - Ultrastructural localization of alpha naphthyl acid esterase in human Tm lymphocytes. - *Am. Jour. of Pathol* 105:1: 40-46. 1981.

29. - Goldberg Arthur F., T. Barka. - Acid phosphatase activity in human blood cells. - *Nature* 4838. 'Haematology' 297 1962.

30. - Head David R., M. Borovitz, L. Cereso, C. Craven, B. Brock, J.M. Boyett, J. Pullen, W. Crist, J. Fallea and G. Bennett. - Acid phosphatase positivity in childhood acute lymphocytic leukemia. *Jour. of Clin. Pathol.* 86;5: 650-653. 1986.

31. - Savage Richard A., R. Valenzuela and G.C. Hoffman. - Acid phosphatase staining pattern as an indicator of T-cell acute leukemia. - *Am. Jour of Clin. Pathol.* 76;6: 760-764. 1981.

32. - Kan yang, R.H. Bearman, G.A. Pangalis, R.J. Selman and H. Rappaport. - Acid phosphatase and alpha-naphthyl acetate esterase in neoplastic and non-neoplastic lymphocytes. *Am. Jour. of Clin. Pathol.* 78;2: 141-149. 1982.

33. - Janckila anthony J., Chin-Yang Li, K.W. Lam and L.T. Yam. - The cytochemistry of tartrate-resistant acid phosphatase. - *Am. Soc. of Clin. Pathol.* 70;1: 45-55. 1978.

34. - Katayama I., C.Y. Li and L.T. Yam. - Ultrastructural cytochemical demonstration of tartrate-resistant acid phosphatase isoenzyme activity in 'hairy cells' of leukemic reticuloendotheliosis. *Am. Jour. of Clin. Pathol.* 69;3: 471-477 1972

35. - Basso G., M.G. Cocito, G. Semenzato, A. Pessutto and L. Zanasco. - Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes. *British Jour. of Haematology* 44: 577-582. 1980.

36. - Crockard Alistair, C. Chalmers, E. Matutes and D. Catovsky. - Cytochemistry of acid hydrolases in chronic B- and T-cell leukemias. *Am. Jour. of Clin. Pathol.* 78;4: 437-444. 1982.

37. - Yam L.T., C.Y. Li and W.H. Crosby. - Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am. Jour. of Clin. Pathol.* 55: 283-290. 1971.

38. - Davey F.R., R.B. Davis, J.H. MacCallum, D. A. Nelson, R.J. Mayer, E.D. Ball, J.D. Griffin, C.A. Schiffer and C.D. Bloomfield. - Morphologic and cytochemical characteristics of acute promyelocytic leukemia. - *Am. Jour. of Hematology* 30: 221-227. 1989.

39. - Tomonaga Masao, Y. Yoshida, H. Tagawa, I. Jinnai, K. Kuriyama, T. Amenomori, A. Yoshioka, T. Matsuo, H. Nonaka and H. Ichimaru. - Cytochemistry of acute promyelocytic leukemia (M3): leukemic promyelocytes exhibit heterogeneous patterns in cellular differentiation. *Blood* 66;2: 350-357. 1985.

40. - Machin Genevieve A., J.P. Halper and D.M. Knowles II. - Cytochemically demonstrable B-Glucuronidase activity in normal and neoplastic human lymphoid cells. *Blood* 56;6: 1111-1119. 1980.

41. - Hayhoe F.G.J. and D. Quaglino. - Refractory sideroblastic anemia and erythraemia mielosis. Possible relationship and cytochemical observations. - *British Jour. or Haematology* 6: 381-387 1960.

42. - Drach J., C. Gattlinger and H. Huber. - Combined flow cytometric assessment of cell surface antigens and nuclear TdT for the detection of minimal residual disease in acute leukaemia. *British Jour. of Haematol.* 77: 37-42 1991.

43. - Lewis D.E., J.V. Giorgi and N.L. Warner. - Flow cytometry analysis of T cells and continuous T-cell lines from autoimmune MRL/l mice. *Nature* 289: 298-290. 1981.

44. - B.Bain, D. Catovsky. - Classification of acute leukaemia 'Current concerns in haematology 2.' 1990.

45. - G. Kohler and C. Milstein. - Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. - *Nature* 256: 495-497. 1975.

46. - Milstein César. - Anticuerpos monoclonales. - *Science* pp100-109 Dic. 1980.

47. - Milstein César. - From antibody structure to immunological diversification of immune response. - *Science* 231: 1261-1268. 1986.

48. - Foon Kenneth and R.F. Todd III. - Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 68;1: 1-31. 1986.

49. - Freedman A.S. and L.M. Nadler. - Cell surface markers in hematologic malignancies. *Seminars in Oncology* 14;2: 193-212. 1987.

50. - Foon K.A., R.J. Billin, P.I. Terasaki and M.J. Cline. Immunologic classification of acute lymphoblastic leukemia, implications for normal lymphoid differentiation. - *Blood*, 56;6: 1120-1126. 1980.

51. - Blumberg R. and R. T. Schooley. - Lymphocyte markers in infectious diseases. *Seminars in Hematology 'Lymphocytes III'* 22;2: 81-108. 1985.

52. - Knowles D.M. and J.P. Halper. - Human T-cell malignancies. 'Correlative clinical, histopathologic, immunologic and cytochemical analysis of 23 cases. - *Am. jour. of Pathol.* 106;2: 187-203. 1982.

53. - Thomas X., L. Campos, E. Archimbaud, Z-H. Schi, D.Treille-Ritouet, B. Anglaret and D. Fiere. - Surface marker expression in acute myeloid leukaemia at first relapse. *Brittish Jour. of Haematology* 81: 40-44. 1992.

54. - Kadin M.E. and R.J. Billings. - B lymphocyte antigens in the differential diagnosis of human neoplasia. *Blood* 51;5: 813-823. 1978

55. - Bennett J., R. Berger, D. Catovsky, G. Flandrin, K.A. Foon, H.G. Galnick, J.D. Griffin, A. Hagemeijer, C. Mecucci, J. Minowada, F. Mitelman, J.L. Preud'Homme, A.A. Sandberg and H. Bandern Berghe. - Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC)

working classification of the acute myeloid leukaemias. (meeting report) *Brittish Jour. of Haematology* 68:487-494. 1988.

56.- Mason D.Y., H. Stein, J. Gerdes, K.A.F. Pulford, E. Ralfkiaer, B. Falini, W.N. Erber, K. Micklem and K.C. Gatter.- Value of Monoclonal anti-CD22 (p135) antibodies for the detection of normal and neoplastic B Lymphoid cells. *Blood* 69;3: 836-840. 1987.

57.- Cabrera M. E. Immunologic classification of Acute Lymphoblastic Leukemia. *The Am. Jour. of Ped. Hematol./Oncol.* 12;3: 283-291. 1990.

58.-Pesando J.M., J. Ritz, H. Lazarus, S. Baseman, S. Sallan and S.F. Schlossman.- Leukemia-Associated Antigens in ALL. *Blood* 54;6: 1240-1248. 1979.

59.- Cantù-Rajoldi A., C. Putti, M. Saitta, D. Granchi, R. Fodà, R. Schirò, M. Castagni, C. Vallengio, M. Jankovic, R. Miniero, P. Paolucci and G. Basso.- Co-expression of myeloid antigens in childhood acute lymphoblastic leukaemia: relationship with the stage of differentiation and clinical significance. *Brittish Jour. of Haematology* 79: 40-43. 1991.

60.-Koziner B., S. Kempin, S. Passe, T. Gee, R. A. Good and B.D. Clarkson.- Characterization of B-cell Leukemias: a tentative immunomorphological scheme. *Blood* 56;5: 815-823. 1980.

61.- Merle-Beral H., L. N. Cong Duc., V. Leblond, C. Boucheix, A. Michel, C. Chastang and P. Debre.- Diagnostic and prognostic significance of myelomonocytic cell surface antigens in acute myeloid leukaemia. *Brittish Jour. of Haematol.* 73: 323-330. 1989.

62.- Ackland S.P., C.A. Westbrook,, M.O. Fiaz, M.M. Le Beau and J.D. Rowley.- Evidence favoring lineage fidelity in acute nonlymphocytic leukemia: absence of immunoglobulin gene rearrangements in FAB types M4 and M5. *Blood* 69;1: 87-91. 1987.

63.-Ritz H. and S.F. Schossmann.- Utilization of Monoclonal antibodies in the treatment of leukemia and lymphoma. *Blood* 59;1: 1-11. 1982.

64.- Lilleyman J.S., I.M. Hann, R.F. Stevens, S.M. Richards and O.B. Eden.- Blast cell vacuoles in childhood lymphoblastic leukaemia *Brittish Jour. of Haematol.* 70: 183-186. 1988.

65.- Dighiero G., P. Travade, S. Cheuret, P. Fenaux, C. Chastang, J.L. Binet and The French Cooperative group on CLL.- B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. *Blood* 78;8: 1901-191. 1991.

66.- Ritz J., L.M. Nadler, A.K. Bhan, J.N. McConarty, J.M. Pesando and S.F. Schlossman.- Expression of Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen (CALLA) by lymphomas of B-Cell and T-Cell Lineage. *Blood* 58;3: 648-652. 1981.

67.- Metcalf C., D. Hilton and N.A. Nicola.- Leukemia Inhibitory Factor Can Potentiate Murine Megacaryocyte Production in Vitro. *Blood* 77;10: 2150-2153. 1991.

68.- Reinherz E.L. and S. F. Schlossman.- The characterization and function of human immunoregulatory T-lymphocyte subsets. *Immunology Today*. pp 69-75 April de 1981.

69.- Maheu M., M.A. Baker, J.A. Falk and R.N. Taub.- Immunologic Diagnosis and Monitoring of Human Acute Leukemias. 'A review'. *Am Jour. of Pathol.* 103;1: 139-157.

70.- Lilleyman J.S., I.M. Hann, R.F. Stevens, s. M. Richards, O.B. Eden, J.M. Chesells and C.C. Bailey.- Cytomorphology of childhood lymphoblastic leukaemia a prospective study of 2000 patients.- *Brittish Jour. of Haematol.* 81: 52-57. 1992.

71.- Todd R.F., M. Lee and S. F. Scholssman.- Antigens on human monocytes identified by monoclonal antibodies.-*The Jour. of Immunology* 126;4: 1435-1442. 1981.

72.- K. Yanagisawa, T.Horiuchi and S. Fujita.- Establishment and characterization of a New Human Leukemia Cell Line Derived From Ms Eo. *Blood* 78;2: 451-457. 1991.

73.- P. Solail-Celigny, B. Desaint, A. Herrera, C. Chastang, M. Amar, M. Vrocians, N. Brousse, F. Mancilla, M. Renoux, J.F. Bernard and P. Boivin.- Chronic Myelomonocytic Leukemia According to FAB Classification: analysis of 35 cases. *Blood* 63;3: 634-638. 1984.

74.- Hsu S.M., K.Yang and E.S. Jaffe.- Hairy Cell Leukemia: A B-Cell neoplasm with a Unique Antigenic Phenotype. *Am. Jour. of Clin. Pathol.* 80;4: 421-428. 1983.

75. - Janckila A. J., G.T. Stelzer, J. H. Wallace and L.T. Yam. - Phenotype of Hairy Cells of Leukemic Reticuloendotheliosis Defined by Monoclonal Antibodies. *Am. Jour. of Clin. Pathol.* 79;4: 431-437. 1982.

76. - Canizo M.C., J. F. San Miguel, M. González, J. P. Anta, A. Orfao and A. Lopez-B. Discrepancies Between Morphologic, Cytochemical, and immunologic Characteristics in Acute Myeloblastic Leukemia. - *Am. Jour. of Clin. Pathol.* 88;1: 38-42 1987.

77. - Ball E.D., R.B. Davis, J.D. Griffin, R.J. Mayer, F.R. Davey, D.C. Arthur, D. Wurster-Hill, W. Noll, M.T. Eighetany, S.L. Allen K. Rai, E.J. Lee, C.A. Schiffer and C.D. Bloomfield. - Prognostic value of lymphocyte surface markers in acute myeloid leukemia. *Blood* 77;10: 2242-2250. 1991.

78. - Mirro J. and S.A. Stass. - Fluorescent Microsphere Detection of Surface antigens and Simultaneous Cytochemistries in Individual Hematopoietic Cells. *Am. Jour. of Clin. Pathol.* 83;1:7-11 1985.

79. - Ming S. L. Raine and H. Fanger. - The Use of Antiavidin Antibody and Avidin-Biotin-Peroxidase Complex in immunoperoxidase Technics. *Am. Jour. of Clin. Pathol.* 75;6: 816-821 1981.

80. - Erber W.N and D. Y. Mason. - Immunoalkaline Phosphatase Labeling of Terminal Transferase in Hematologic Samples. - *Am. Jour. of Clin. Pathol.* 88;1: 43-50. 1987.

81. - Neumann H.P., I. de Solas, J.L. Parkin, K. Gajl-Peczalska, R. W. McKenna, C.K. Berkley, W. L. Nichols and R. D. Brunning. - Monoclonal Antibody Study of Philadelphia Chromosome Positive Blastic Leukemias Using the Alkaline Phosphatase anti-Alkaline Phosphatase (APAAP) Technic. *Am. Jour. of Clin. Pathol.* 85;5: 564-572. 1986.

82. - Bollum F.J. - Terminal Deoxynucleotidyl Transferase as a Hematopoietic Cell Marker. 'Review' *Blood* 54;6: 1203-1215. 1979.

83. - Lanham G.R., F.J. Bollum and S.A. Stass. - Detection of Terminal Deoxynucleotidyl Transferase in Acute Leukemias Using Monoclonal Antibodies Directed against Native and Denatured Sites. *Am. Jour. of Clin. Pathol.* 86;1: 88-91 1986.

84.- Cibull M.L., M. S. Coleman, O. Nelson, J. J. Hutton, D. Gordon and F. J. Bollum.- Evaluation of Methods of Detecting Terminal Deoxynucleotidyl Transferase in Human Hematologic Malignancies.- *Am. Jour. of Clin. Pathol.* 77;4: 420-423 1982.

85.- Bearman R.M. , C.D. Winberg, W.C. Maslow, B. Racklin, F. Carlson, B. Nathwani, H.Kim, L.W. Diamond, B. Fallis and H. Rappaport. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Activity in Neoplastic and Nonneoplastic Hematopoietic Cells. *Am. Jour. of Clin. Pathol.* 75;6: 794-802. 1981.

86.- Janossy G. , A. V. Hoffbrand, M.F. Greaves, K. Ganeshaguru, C.Pain, K. F. Bradstock, H.G. Prentice, H.E.M. Kay and T.A. Lister.- Terminal Transferase Enzyme Assay and Immunological Membrane Markers in the Diagnosis of Leukaemia: a Multiparameter Analysis of 300 cases. *Brittish Jour. of Haematol.* 44: 221-234. 1980.

87.- Swirsku D.M., M.F. Greaves, R.G. Gray and J.K. Rees.- Terminal deoxynucleotidyl transferase and HLA-DR expresion appear unrelated to prognosis of acute myeloid leukaemia.- *Brittish Jour. of Haematol.* 70: 193-198. 1988.

88.- Carroll A.J., W.H. Crist, R.T. Parmley, M. Roper, H.D. Cooper and W.H. Finley.- Pre-B Cell Leukemia Associated with Chromosome Translocation 1:19. 'Concise report' *Blood* 63;3: 721-724. 1984.

89.- Look Thomas A.- Citogenética de la leucemia de la infancia: consecuencias clínicas y biológicas. *Clínicas Pediátricas de Norte América.* Vol. 4 'Leucemias'. pp 779. 1988.

90.- Rowley J.D.- Cytogetic Changes in Leukemia and Their Biologic Significance.-*The Biology of Human Leukemia.* Cap. 7. pp 178-179. 1990.

91.- Campana D.,T.E. Hansen-Hagge, E. Matutes, E. Coustain-Smith, S. Yokota, V. Shelly, C. R. Bartram and G. Janossy.- Phenotypic, Genotypic, Cytochemical, and Ultrastructural Characterisation of Acute Undifferentiated Leukemia.- *Leukemia* 4;9: 620-624. 1990.

92.- Kirsch I.R.- Biología Molecular de las leucemias.-*Clínicas Pediátricas de Norte América 'Leucemias'* Vol. 4 pp 747-759. 1988.

93.- Ribeiro R.C., S. C. Raimondi, F. G. Behm, J. Cherrie, W.H. Crist and C.H. Put.- *Clinical and Biological Features of Childhood T-Cell Leukemia with the t(11;14)*. *Blood* 78;2: 466-470. 1991.

94.- Hara J., K. Yumura-Yagi, A. Tawa, S. Ishihara, M. Murata, N. Terada, Y. Izumi, E. Champagne, Y. Takihara, T. W. Mak, M. Minden and K. Kawa-Ha.- *Molecular analysis of Acute Undifferentiated Leukemia: two distinct Subgroups at the DNA and RNA Levels*. *Blood* 74;5: 1738-1746. 1989.

95.- Israeli S. and T. Lion. - *Multiprimer-PCR for screening of genetic abnormalities in acute lymphoblastic leukaemia*. *British Jour. of Haematol.* 79: 645-647. 1991.

96.- Negrin R.S. and K.G. Blume.- *The Use of the Polymerase Chain Reaction for the Detection fo Minimal Residual Malignant Disease*. *Blood* 78;2: 244-258. 1991.

97.- Campana D., E. Coustain-Smith and G. Janossy.- *The Immunologic Detection of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia*. - *Blood* 76;1: 163-171. 1990.

98.- Montiel C. L., M.E. Rubio B., J.E. González Ll.- *Taller de clasificación de leucemia aguda*. - *Hospital de Especialidades Centro Médico 'La Raza'*. (Investigación Científica en Hematología). pp 1-16. 1992.

99.- Romero G. L.T., G. Escamilla G.- *Manual de clasificación Morfológica, Citoquímica e Inmunológica de las Leucemia Agudas*. - *Lab. de Hematología. Instituto Nacional de Pediatría*. 1990.

100.- Kulenkampff J. G. Janossy and M. F. Freaves.- *Acid Esterase in Human Lymphoid Cells and Leukaemic Blasts: a Marker for T- Lymphocytes*. *British Jour. of Haematol.* 36: 231-240. 1977.

101.- Matutes E., M. Pombo de Oliveira, L. Foroni, R. Morilla and D. Catovsky.- *The role of ultrastructural cytochemistry and monoclonal antibodies in clarifying the nature of undifferentiated cells in acute leukaemia*. *British Jour. of Haematol.* 69: 205-211. 1988.

102.- Yan Yu D., DJ. B. Peter, N. E. Paulus and H. I. Machleder.- *Lymphocyte populations: separation by discontinuous density gradient centrifugation*. - *The Jour. of Immunology.* 110:1615-1622. 1973.



103. - Hing S., H. Zhang and E. S. Jaffe. - Utility of Monoclonal Antibodies Directed Against B and T Lymphocytes and Monocytes in Paraffin-embedded Sections. *Am. Jour. of Clin. Pathol.* 80:4: 415-420. 1983.

104. - Kurec A.S., G. A. Threatte, A.J. Gottlier, J.R. Smith, J. Anderson and F.R. Davey. - Immunophenotypic subclassification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Brittish Jour. of Haematol.* 81: 45-51. 1992.

105. - Van der Schoot C. E., G. M. Daams, J. Pinkster, R. Vet and A.E.C. von dem Borne. Monoclonal antibodies against myeloperoxidase are valuable immunological reagents for the diagnosis of acute myeloid leukaemia. *Brittish Jour. of Haematol.* 74: 173-178. 1990.

106. - Palutre M., P. Tabaczka, C. Varadachari and G. Carrillo. - 37°C E. Rosettes in Various Malignant and Non-malignant Disorders. *Brittish Jour. of Haematol.* 43: 361-367. 1979.

107. - Bernard A., F. Aubrit, B. Raynal, D. Pham and L. Bounsell. - A T-Cell surface molecule different from CD2 is involved spontaneous rosette formation with erythrocytes. *The Jour. of Immunol.* 140: 1802-1807. 1987.

108. - Nadler, L.M. y cols. - B-Cell origin of non-T cell acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Invest.* 74:332-340. 1984.

109. - Diccionario Médico. - Manuales Salvat. - 3a. Ed. Salvat Editores 1990.

## APENDICE A

En virtud de que todas las observaciones son al microscopio se ha establecido un criterio de inclusión para dar como positivo o negativo un resultado, a saber:

En la clasificación morfológica se siguen los criterios del grupo cooperativo Franco Americano Británico (FAB), como ya se ha indicado en varias ocasiones, o sea con el siguiente esquema de puntuación para leucemia linfoblástica L1 y L2:

	L1	L2
> 0 = a 75% de las células está a expensas del núcleo	+	-
Nucleolos Pequeños	+	-
Grandes	-	+
Contorno del núcleo, redondo delgado membrana sin indentaciones o hendiduras en > 0 = a 25% de las células		-
Tamaño del núcleo ..... pequeño		
grande		-

L1 = 0 a +2

L2 = 1- a -4

Para Leucemia aguda mieloblástica:

M1 Leucemia mieloblástica sin maduración

90% o más de mieloblastos no granulares o escasos con pocos gránulos azurófilos y bastones de Auer.

dos o más nucleolos prominentes

Menos de 10% de células con cierto grado de maduración

3% o más de blastos mieloperoxidasa positiva.

M2 Leucemia mieloblástica con maduración

30 a 89% de mieloblastos

= o > de 10% de promielocitos y células con diferentes grados de maduración

blastos con nucleolos prominentes

cantidad de citoplasma variable

gránulos azurófilos y escasos bastones de Auer

< de 20% de monocitos.

- M3** Leucemia premielocítica hipergranular  
 más de 10% de las células son premielocitos anormales con  
 granulaciones gruesas  
 núcleos de forma y tamaño variable, reniforme o lobulado  
 citoplasma ocupado completamente por gránulos grandes  
 proporción variable de células características que contienen  
 abundantes bastones de Auer (células astilladas o 'faggot')
- M4** Leucemia mielomonocítica  
 diferenciación granulocítica y monocítica  
 más de 30% de blastos  
 la suma de mieloblastos, premielocitos, mielocitos y  
 granulocitos maduros es >30% y < de 80%  
 la proporción de premonocitos y monocitos es de más de 20%  
 en sangre periférica la cuenta de monocitos y premonocitos es  
 de  $5 \times 10^9/l$  o más.
- M5** Leucemia monocítica  
 > de 80% de células monocíticas  
 Tipo A: escasa diferenciación (monoblástica)  
 80% o más de las células monocíticas son  
 monoblastos grandes  
 nucleolos vesiculares prominentes  
 citoplasma voluminoso, puede presentar uno o más  
 pseudópodos, basófilo y con escasos gránulos azurófilos  
 menos de 20% de premonocitos.
- Tipo B: diferenciada  
 < de 80% de las células monocíticas son monoblastos  
 monoblastos con núcleo grande de apariencia  
 cerebriforme  
 citoplasma grisáceo con finos gránulos azurófilos  
 predominan premonocitos y monocitos  
 menos de 10% de componente granulocítico  
 ambos tipos pueden contener escasos bastones de Auer.
- M6** Eritroleucemia  
 50% o más de componente eritropoyético  
 eritroblastos con rasgos morfológicos bizarros, núcleo  
 multilobulado, núcleos múltiples

*presencia de fragmentos nucleares  
formas gigantes y rasgos megaloblásticos  
30% o más de mieloblastos y premyelocitos  
megacariocitos anormales, formas mononucleares o  
micromegacarioblastos.*

**M7 Leucemia megacarioblástica**

*>30% de blastos, de los cuales, la tercera parte debe  
demostrarse que sean megacarioblastos  
células pleomórficas semejantes a L1 o L2  
tamaño celular heterogeneo  
protusiones hialinas, pseudópodos citoplásmicos con plaquetas  
este grupo debe apoyarse para su clasificación en:  
evaluación ultraestructural  
citoquímicas  
anticuerpos monoclonales.*

*Los resultados del diagnóstico morfológico se encuentran  
agrupados en el cuadro No. 2 y la gráfica correspondiente. Algunos  
de los rasgos característicos se presentan en las fotografías  
tomadas al microscopio, de los frotis de médula ósea de varios de  
los pacientes diagnosticados.*

## APENDICE B

### GLOSARIO DE TERMINOS MEDICOS

- Adenomegalia.* - Hipertrófia de una glándula o ganglio.
- Adinamia.* - Falta o pérdida de fuerza. =Astenia.
- Anorexia.* - Falta de apetito.
- Artralgia.* - Dolor en una articulación.
- Auscultar.* - Método de examen físico que consiste en escuchar los sonidos que se producen dentro del cuerpo, especialmente en el corazón, vasos y aparato respiratorio.
- Bipalpebral.* - Los dos párpados.
- Cardiomegalia.* - Hipertrófia cardíaca.
- Cefalea.* - Dolor de cabeza = Cefalalgia.
- Convulsión.* - Contracción violenta e involuntaria de la musculatura estriada del cuerpo, secundaria a un mecanismo anóxico, epiléptico o tóxico.
- Disnea.* - Dificultad en la respiración. Puede ser inspiratoria o expiratoria.
- Edema.* - Acumulación abundante de líquido seroalbuminoso en el tejido celular debido a diversas causas: disminución de la presión osmótica del plasma por reducción de proteínas; aumento de la presión hidrostática en los capilares por insuficiencia cardíaca; mayor permeabilidad de las paredes capilares u obstrucción linfática.
- Encefalopatía.* - Enfermedad o trastorno del encéfalo.
- Epistaxis.* - Hemorragia por las fosas nasales.
- Equimosis.* - Extravasación de sangre en el interior de los tejidos. Coloración producida por infiltración de sangre en el tejido celular subcutáneo o por la ruptura de vasos capilares.
- Esplenomegalia.* - Aumento de volumen o hipertrofia del bazo.
- Fiebre.* - Síndrome complejo integrado por hipertermia, taquicardia, taquipnea, estado saburral, quebrantamiento e intranquilidad o estupor.
- Hepatomegalia.* - Aumento de volumen del hígado.
- Hiperuricemia.* - Exceso de ácido úrico en la sangre y efectos consecutivos.
- Hipoxia.* - Anoxia moderada , oxidación insuficiente.

*Insuficiencia cardíaca.* - Término general para las afecciones cardíacas llegadas al período de hiposístolia.

*Evacuaciones melénicas.* - Expulsión de sangre alterada por el ano, sola o con heces.

*Nefropatía.* - Término general para las enfermedades del riñón.

*Petequia.* - Pequeña mancha en la piel formada por efusión de sangre; no desaparece por la compresión del dedo.

*Síndrome.* - cuadro o conjunto sintomático; serie de síntomas y signos que existen a un tiempo y definen clínicamente un estado morboso determinado.

*Síndrome de Down.* - Anomalía congénita por alteración cromosómica (trisomía 21), que se caracteriza por deficiencia mental, facies mongoloide, macroglosia, braquicefalea, braquidactilia, hipotonía muscular, y tendencia a otras malformaciones = Mongolismo.

*Sístole.* - Período de contracción cardíaca, especialmente de los ventrículos, que tiene por objeto arrojar la sangre recibida de las aurículas a las arterias aorta y pulmonar.

*Saburra.* - Materia mucosa espesa no digerida en el estómago o formando una capa sobre la lengua de moco y células descamadas.

*Taquicardia.* - Aceleración de los latidos cardíacos.

*Taquipnea.* - Respiración acelerada y superficial.